

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Dominik Oliver

VAP-Proteine sind wesentliche Bestandteile nativer HCN2-Kanalkomplexe und regulieren die Funktion des kardialen I_f -Schrittmacherstroms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von
Nicole Silbernagel
geboren am 07.11.1986 in Stuttgart

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Phillips-Universität Marburg am: 27.06.2016
Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent: Prof. Dr. Niels Decher
1. Korreferent: Prof. Dr. Wolfram Grimm

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary	V
1 Einleitung	1
1.1 Ionenkanäle	1
1.2 Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated cation channels (HCN-Kanäle)	3
1.3 Vesicle associated membrane associated protein B (VAPB)	14
1.4 Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bibliothek-„Screen“ identifiziert VAPB als neuen Interaktionspartner des HCN2-Kanals	19
1.5 Ziel der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Molekularbiologie	25
2.2 Zellkultur	40
2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen	42
2.4 Statistik	46
2.5 Fluoreszenzmikroskopie	47
3 Ergebnisse	48
3.1 Die Familie der VAP-Proteine und Proteine des SNARE-Komplexes interagieren mit dem HCN2-Kanal	48
3.2 Elektrophysiologische Untersuchungen bei einer Ko-Expression des VAPB-Proteins	55
3.3 Der Einfluss des VAPB-Proteins auf die Distribution des HCN2-Proteins nach Ko-Transfektion in Säugetierzellen	67
3.4 Das VAPB-Protein interagiert über den N-Terminus des HCN2-Kanals	76
3.5 Die über das VAPB vermittelte Stromamplitudenmodulation wird durch eine veränderte Oberflächenexpression des HCN2-Kanals verursacht	79
3.6 Das VAPB-Protein hat Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der spontanaktiven Herzmuskelzelllinie HL-1	85
3.7 VAPB „Knock-Out“-Mäuse zeigen einen kardialen Phänotyp	94

4	Diskussion	99
4.1	„GST-Pulldown“-Experimente weisen eine Protein-Protein Interaktion mit dem HCN2-Kanal nach	99
4.2	Das VAPB-Protein moduliert lediglich die Stromamplitude des HCN1- und HCN2-Kanals	101
4.3	Die Interaktion zwischen dem HCN2-Kanal und dem VAPB-Protein wird durch dessen N-Terminus vermittelt	107
4.4	Das VAPB-Protein ko-lokalisiert mit dem HCN2-Kanal nach Ko-Transfektion, sowie in kortikalen Neuronen	109
4.5	VAPB moduliert die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals nach Ko-Expression in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten oder HeLa-Zellen	112
4.6	Die elektrophysiologischen Eigenschaften der HL-1 Zellen sind abhängig von der funktionellen Expression des VAPB-Proteins	115
4.7	Bradykardie in VAPB „Knock-Out“-Mäusen	118
4.8	Ausblick	121
5	Literaturverzeichnis	123
6	Anhang	132
6.1	Abkürzungsverzeichnis	132
6.2	Abbildungsverzeichnis	134
6.3	Tabellenverzeichnis	137
6.4	Verwendete Plasmide	137
6.5	Publikationen	140
6.6	Tabellarischer Lebenslauf	141
6.7	Liste akademischer Lehrer	141
6.8	Danksagung	142

Zusammenfassung

HCN-Kanäle erfüllen die Schrittmacherfunktion in erregbaren Zellen des Herzmuskelgewebes und in vielen Neuronen des zentralen Nervensystems. Sie kontrollieren die Feuerrate der Neurone und somit die Frequenz der Aktionspotentiale. Sie haben die Eigenschaft während einer Hyperpolarisation der Membran zu aktivieren und so diese zu depolarisieren.

Das Vesicle associated membrane associated protein B (VAPB) wurde durch M. Walecki (2011) erstmalig im Zusammenhang des HCN2-Kanals beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das VAPB-Protein ein endogener Interaktionspartner des HCN2-Kanals ist und einen modulatorischen Effekt auf die Herzfrequenz, sowie die neuronale Distribution hat. Das VAPB-Protein hat einen zeitunabhängigen, jedoch konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Stromamplitude. Das Öffnungsverhalten, sowie die Aktivierungskinetik bleiben hierbei unbeeinflusst. Neben dem VAPB-Protein zeigten auch das separat codierte Familienmitglied VAPA und seine in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner VAMP1 und VAMP2 eine Modulation auf die Stromamplitude. Wohingegen die Isoform VAPC keinen Einfluss auf die Stromeigenschaften des HCN2-Kanals hat. Elektrophysiologische Messungen von trunkierten HCN2-Kanälen zeigten, dass der C-Terminus nicht essentiell für die Interaktion ist, während eine Trunkation des HCN2 N-Terminus zu einem Verlust der Interaktion führt. Ebenfalls essentiell ist die Transmembrandomäne des VAPB-Proteins, welche die Interaktion vermittelt. Sowohl Chemilumineszenzassays in Säugetierzellen, als auch in *Xenopus laevis* Oozyten zeigten eine erhöhte Oberflächenexpression des HCN2-Proteins in Anwesenheit des VAPB. Bei der Analyse der Interaktion mittels „GST-Pulldown“-Experimenten wurde gezeigt, dass das VAPB-Protein direkt mit dem HCN2-Protein interagiert, jedoch unterstützt durch das VAPA-Protein. Insbesondere zeigte sich bei Antikörperfärbungen von kortikalen Neuronen, dass das VAPB-Protein einen Einfluss auf die zelluläre Distribution des HCN2-Kanals hat. Das HCN2-Protein verteilte sich gleichmäßig über das gesamte Neuron bei einer Transfektion mit VAPB. Das ALS8 assoziierte VAPB-P56S (Punktmutante) führt dagegen zu einer vesikelartigen Distribution, die im Wesentlichen auf den Zellkörper beschränkt ist. Zusammengefasst sprechen die Ergebnisse dafür, dass das VAPB-Protein einen „Trafficking“-Effekt auf das HCN2-Protein hat, das heißt einen Einfluss auf dessen zytosolischen Transport an die Membran. „Patch-Clamp“-Experimente der spontan aktiven Herzmuskelzelllinie HL-1 zeigten unter „Knock-Down“ Bedingungen

mittels shVAPB eine verlängerte diastolische Depolarisation mit der Folge einer gesteigerten Aktionspotentialbreite (APD_{50}). Bei Messungen der endogenen HCN-vermittelten I_f -Ströme in HL-1 Zellen konnte beobachtet werden, dass die Stromamplitude durch ein Fehlen des VAPB-Proteins verringert und insbesondere die Aktivierungskinetik verlangsamt wird. Bei einer Überexpression des VAPB Proteins in HL-1 Zellen kommt es zu einer Beschleunigung der Schlagfrequenz und der Aktivierungskinetik der gemessenen I_f -Ströme. Neben zellulären Experimenten in HL-1 Zellen bestätigten *in vivo* Experimente von VAPB-„Knock-Out“-Mäusen den Einfluss des VAPB-Proteins auf die Herzfrequenz. Die Mäuse zeigten in EKG Aufzeichnungen eine deutliche Verlangsamung der Herzschlagrate und somit eine Sinusbradykardie.

Summary

HCN channels have been described to contribute to the pacemaking mechanism of excitable cells of the heart muscle and in neurons of the central nervous system. HCN channels control the action potential fire frequency in these cells. They are open within hyperpolarization and accordingly drive a depolarization of the membrane.

The vesicle associated membrane associated protein B (VAPB) was initially described as a modulator of the HCN2 channel in 2011 by M. Walecki. In the here presented thesis VAPB was identified as an endogenous interaction partner with modulatory effect on heart rate and neuronal distribution of the HCN2. VAPB has a time-independent but concentration-dependent impact on the current amplitude of HCN2. However the activation kinetics and the gating of the channel is not altered by a co-expression. Besides VAPB, its family member VAPA and its previously described interaction partners VAMP1 and VAMP2 show a significant relevance on current amplitude. In contrast the family member VAPC had no effect on current properties. Electrophysiological measurements of N- or C-terminal truncations of the HCN2-protein showed that the C-terminus is not essential for the interaction, while a depletion of the N-terminus leads to a loss of modulation. Likewise the transmembrane domain of the VAPB-protein is essential for the interaction. Surface expression assays of mammalian cells and *Xenopus laevis* oocytes revealed a higher surface expression of HCN2 induced by a co-expression with VAPB. GST pulldown experiments demonstrated that the interaction of VAPB and HCN2 is indirect and mediated by VAPA. In presence of VAPB the HCN2 distribution in neurons is altered. Transfection of cortical neurons with VAPB leads to a smooth allocation of the HCN2-protein, whereas mutant VAPB (VAPB-P56S) leads to an accumulation of the protein in vesicles of the soma. These findings allowed the hypothesis that the VAPB has an effect on the trafficking of HCN2. Patch Clamp experiments of the spontaneously active heart muscle cell line HL-1 showed a prolonged diastolic depolarization and action potential duration (APD₅₀) under knock-down conditions via shRNA. In addition, recording the HCN mediated I_f -currents of HL-1 cells missing the VAPB protein the current amplitude was reduced and a deceleration of the activation kinetics is observed. On the other hand an overexpression of VAPB in HL-1 cells leads to an acceleration of the beating frequency and the activation kinetics of I_f -currents. Furthermore examining VAPB knock-out mice revealed a cardiac phenotype particularly a bradycardia.

1 Einleitung

Diese Doktorarbeit befasst sich mit dem in einem Hefe-Zwei-Hybrid-“Screen“ identifizierten Protein VAPB, welches in der Lage ist, den HCN2-Kanal in seinen elektrophysiologischen Eigenschaften zu modulieren (Walecki 2011). Die Daten dieser Arbeit beschreiben das VAPB-Protein als Untereinheit und Interaktionspartner des HCN-Kanals mit Relevanz für die Herzphysiologie und die Distribution des HCN2-Kanals auf neuronaler Ebene.

1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle verfügen über Transmembrandomänen, welche aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften eine Membran durchspannen können. Sie bilden eine Pore aus, die es geladenen Teilchen – wie Ionen – ermöglicht, die lipophile Membran zu passieren. Der Transport dieser Ionen erfolgt jedoch passiv unter dem Einfluss des elektrochemischen Gradienten, sodass ein Nettostrom entsteht, der über die Membran fließt (Hille 1978). Dieser Strom kann mit unterschiedlichen Techniken beobachtet und analysiert werden. In dieser Arbeit wurden die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Two Electrode Voltage Clamp - TEVC) und die Patch-Clamp-Technik verwendet. Für die TEVC-Technik werden Oozyten des *Xenopus laevis* Krallenfroschs als Expressionssystem genutzt. Diese Technik beruht auf der Verwendung von zwei Glaselektroden. Während die eine Elektrode lediglich die Spannung vorgibt, dient die andere Elektrode zur Messung der Stromveränderung. Als Referenz dient eine Badelektrode, die es ermöglicht, den Spannungsunterschied zwischen der intrazellulären und extrazellulären Lösung zu bestimmen. Die Patch-Clamp-Methode verwendet neben der Badelektrode dagegen nur eine Elektrode für die Bestimmung der Potentialdifferenz und die Strommessung, ist jedoch, aufgrund ihrer höheren Empfindlichkeit, für Säugetierzellen geeignet. Zusätzlich können bei der Patch-Clamp-Methode auch unterschiedliche Konfigurationen gewählt werden. In dieser Arbeit wurde die „Whole-Cell“ verwendet. Bei der „Whole-Cell“-Konfiguration wird mit der Pipette, durch das Anlegen von Unterdruck, ein Loch in die Oberflächenmembran gerissen und anschließend die gesamte Zelle auf die gewünschte Spannung geklemmt. Hierbei kann die Gesamtheit der fließenden Ströme durch die vorhandenen Ionenkanäle gemessen werden. Grundsätzlich können zwei Klassen an Ionenkanälen definiert werden, die ionotropen Rezeptoren (ligandengesteuerte Ionenkanäle) und die spannungsabhängigen Ionenkanäle. Ligandengesteuerte Ionenkanäle werden durch das Binden eines Liganden aktiviert und werden daher als Rezeptoren bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde sich auf die spannungsabhängigen Ionenkanäle fokussiert. Diese Ionenkanäle öffnen sich, aufgrund einer Veränderung der Spannung, abweichend vom Ruhemembranpotential. Detektieren können sie diese Spannungsveränderung durch den sogenannten Spannungssensor, der sich in einem der Transmembransegmente (S4) befindet und mehrere positiv geladene Aminosäuren enthält. Durch die Veränderung der Spannung wird der Spannungssensor innerhalb der Membran verschoben. Es kommt zu einer Konformationsänderung, welche die Öffnung der Pore induziert. Dieses Öffnungs- und Schließverhalten eines Ionenkanals bezeichnet man als „Gating“ (Catterall 1995). Um die Funktion an der Membran zu erfüllen, müssen Ionenkanäle durch zytosolische Proteine reguliert werden und mittels intrazellulären Transports an die Membran gelangen. Dieser Vorgang wird als „Trafficking“ bezeichnet. Um eine Selektivität der Ionenkanäle zu erreichen, verfügen sie über einen Selektivitätsfilter, der durch eine bestimmte Aminosäuresequenz (Signatur-Sequenz GYG) das Passieren der Ionen reguliert (Catterall 1995). Diese Eigenschaften können auch auf die Familie der Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated cation channels (HCN-Kanäle) übertragen werden, die in dieser Arbeit im Zusammenhang mit dem Vesicle associated membrane associated protein B (VAPB) untersucht werden.

1.2 Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated cation channels (HCN-Kanäle)

Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated cation channels (HCN-Kanäle) verdanken ihren Namen ihrem unüblichen Aktivierungsverhalten (Biel et al. 2009). Da sie, entgegen der Mehrzahl spannungsgesteuerter Ionenkanäle, während einer Hyperpolarisation der Membran öffnen und Ionen die Membran passieren lassen. Unter Ruhemembranpotentialbedingungen entsteht ein Einwärtsstrom, der die Zellmembran depolarisiert (Biel et al. 2009). HCN-Kanäle spielen eine wesentliche Rolle bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen in Zellen und Gewebe. Sie initiieren und regulieren den Herzschlag (DiFrancesco 1993), kontrollieren die rhythmische Aktivität in neuronalen Schaltkreisen (Pape und McCormick 1989) sowie die synaptische Transmission in Neuronen (Beaumont und Zucker 2000). Eine weitere Aufgabe der HCN-Kanäle ist es, das Ruhemembranpotential der jeweiligen Zelle zu beeinflussen (Williams und Stuart 2000). Funktionell handelt es sich um selektive Kationenkanäle, die lediglich Natrium- und Kaliumionen durch ihre Pore passieren lassen (Frace, Maruoka und Noma 1992, DiFrancesco 1993). Bei steigender Kaliumkonzentration wird die Stromamplitude des HCN-Stroms moduliert und nimmt zu (Ludwig et al. 1998; Macri et al. 2002; Moroni et al. 2000). Innerhalb der HCN-Familie sind vier Untereinheiten für HCN-Kanäle bekannt: HCN1, HCN2, HCN3 und HCN4, die sich in ihren physiologischen Eigenschaften und Aminosäuresequenz unterscheiden (Ludwig et al. 1998).

In den folgenden Kapiteln sollen eine kurze Einführung in die Familie der HCN-Kanäle sowie ein Einblick in den derzeitigen Forschungsstand, der sich mit den Charakteristika der HCN-Familie beschäftigt, gegeben werden.

1.2.1 Aufbau und Pharmakologie der HCN-Familie

Ein HCN-Kanal besteht aus vier Untereinheiten, die jeweils über sechs α -helikale Transmembransegmente (S1-S6) verfügen (Biel et al. 2009). Eine schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus ist in Abbildung 1.1 zusammengefasst. Chen *et al.* beschrieben das S4-Segment als Spannungssensor, der neun Arginin- und Lysinreste enthält, die an jeder dritten Aminosäure positioniert sind. Hierdurch entsteht eine geladene α -Helix, welche Spannungsveränderungen detektieren kann (Chen et al. 2000). Die porenformende Domäne liegt zwischen dem S5- und S6-Segment. Sie verfügt über einen Selektivitätsfilter, der mit einer innerhalb der Kaliumkanal-Familie konservierten Aminosäuresequenz (Glyzin (G)-Tyrosin (Y)-Glyzin (G)), zu einer

selektiven Permeabilität der Kanäle für Kaliumionen führen sollte (Doyle et al. 1998). Interessanterweise jedoch ist der HCN-Kanal, trotz des Selektivitätsfilters, zusätzlich für Natriumionen permeabel. Generell besteht jedoch eine höhere Leitfähigkeit für Kaliumionen und variiert hierbei in einem Verhältnis ($P_{Na}:P_K$) von 1:3 bis 1:5 abhängig vom Expressionsmodell oder Versuchsaufbau (Biel et al. 2009). Dagegen nahezu impermeabel ist die Pore der HCN-Kanäle für Lithiumionen (Ho, Brown und Noble 1994; Wollmuth 1995).

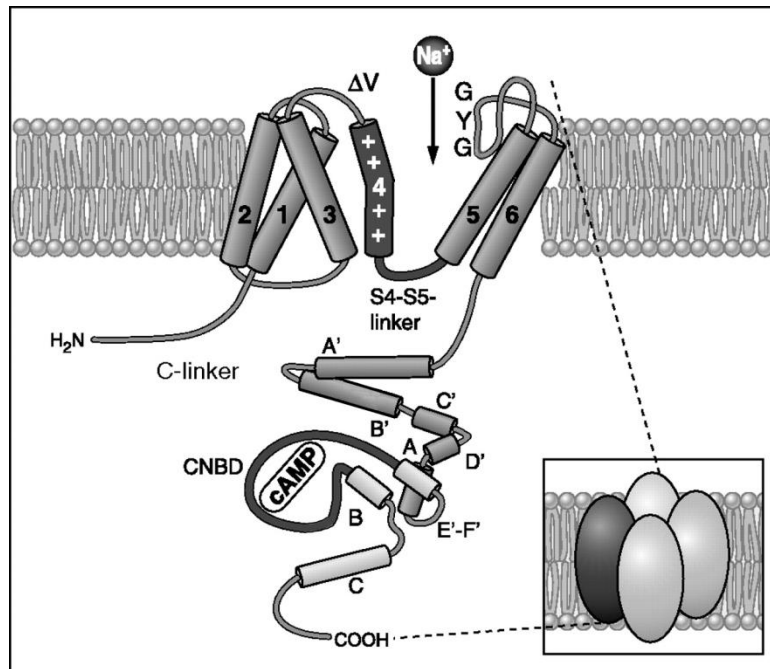


Abbildung 1.1 Struktureller Aufbau einer Untereinheit des HCN-Kanals (mod. nach Biel et al. 2009)

Darstellung des strukturellen Aufbaus des HCN-Kanals, der aus vier Untereinheiten gebildet wird (Tetramer, Bild unten rechts). Jede Untereinheit hat sechs Transmembrandomänen. Der N- sowie der C-Terminus befinden sich intrazellulär. Das S4-Segment dient als Spannungssensor durch seine positiv geladenen Aminosäuren (gekennzeichnet durch +) und ist über den S4-S5-Linker mit dem S5-Segment verbunden. Das S5- und S6-Segment sind die porenbildenden Domänen. Eine Verbindung besteht zwischen den beiden Segmenten über die ausgebildete Porenschleife, welche den Selektivitätsfilter mit der Konsensussequenz GYG trägt. Innerhalb des C-Terminus befinden sich der C-Linker und die CNBD (Cyclic Nucleotide Binding Domain). Der C-Linker besteht aus sechs α -Helices (A'-F'). Darauf folgend ist die CNBD aus drei α -Helices (A-C) und einer β -Faltblatt Struktur (dunkelgraue Linie zwischen A und B). Die CNBD dient als Bindestelle für cAMP.

Sowohl der C-Terminus, als auch der N-Terminus des Proteins befinden sich intrazellulär. Während sich die HCN-Familie in ihrem N-Terminus stark unterscheidet, befinden sich im C-Terminus hochkonservierte Bereiche: der C-Linker und die **Cyclic Nucleotide Binding Domain (CNBD)**. Der C-Linker hat eine Länge von ~80 Aminosäuren und besteht aus sechs α -Helices. Er verbindet das S6-Segment mit der darauf folgenden CNBD (~120 Aminosäuren) (Biel et al. 2009). Mittels Kristallstruktur konnte nachgewiesen werden, dass die CNBD fähig ist, cAMP zu binden (Zagotta et al. 2003), welches die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu positiveren Potentialen

verschiebt. Erklärt wird dies über eine Konformationsänderung (Craven und Zagotta 2006). Im geschlossenen Zustand ist der strukturelle Aufbau sehr kompakt. Der C-Linker wird zur sterischen Behinderung für die Öffnung der Pore, sodass der Kanal inhibiert und blockiert wird. Durch das Binden von cAMP entfernt sich der C-Linker räumlich von der Porenöffnung, sodass der offene Zustand favorisiert wird, Ionen durch die Kanalpore passieren können und ein Strom fließt (Craven und Zagotta 2006).

Die Aktivierung des HCN-Kanals ist abhängig von der Spannung, welche an der Membran anliegt. Bei einem Potential von -30 mV oder positiver liegen die HCN-Kanäle im geschlossenen Zustand vor, während bei negativeren Membranpotentialen die Kanäle in den offenen Zustand übergehen. Als Maßeinheit für das Öffnungs- und Schließverhalten wird die Spannung bei halbmaximaler Aktivierung ($V_{1/2}$) genutzt. Sie beschreibt die Spannung, bei der 50% der Kanäle im offenen Zustand vorliegen. Jede der vier HCN-Untereinheiten hat eine charakteristische halbmaximale Aktivierung in Abhängigkeit vom Potential ($V_{1/2}$), weshalb dieser Wert als Unterscheidungsmerkmal der vier Untereinheiten verwendet werden kann. In HEK Zellen lag die $V_{1/2}$ für HCN1 bei ca. -70 mV, für HCN2 bei ungefähr -95 mV, danach folgen HCN3 mit -77 mV und HCN4 mit -100 mV (Stieber et al. 2005). Die halbmaximale Aktivierung ist jedoch abhängig vom Zelltyp, den in der Zelle vorliegenden modulatorischen Faktoren, dem experimentellen Aufbau und in Geweben abhängig vom Expressionslevel der einzelnen Untereinheiten (HCN1-4) (Biel et al. 2009). In *Xenopus laevis* Oozyten wurde eine $V_{1/2}$ von -73 mV für den HCN2-Kanal gemessen (Chen et al. 2000). Im Vergleich dazu hat ein homomerer HCN1-Kanal in HEK-293 Zellen eine $V_{1/2}$ von ca. -70 mV, der HCN3-Kanal ca. -80 mV und der HCN4-Kanal eine halbmaximale Aktivierung von ca. -100 mV (Stieber et al. 2005). Obwohl sowohl der C-Linker, als auch die CNBD hochkonservierte Aminosäuresequenzen enthalten, fällt der Effekt von cAMP auf die Spannungsabhängigkeit zwischen den einzelnen Untereinheiten unterschiedlich stark aus. Während HCN2 und HCN4 eine hohe Sensitivität gegenüber cAMP aufweisen, sind die Untereinheiten HCN1 und HCN3 nur schwach beziehungsweise nicht durch cAMP reguliert (Altomare et al. 2003; Viscomi et al. 2001).

Nicht nur die Reaktion auf cAMP, sondern auch die Aktivierungskinetik unterscheidet sich zwischen den HCN-Untereinheiten (Altomare et al. 2003; Moosmang et al. 2001). Die HCN1-Untereinheit hat die schnellste Aktivierungskinetik (Abbildung 1.2), die weiteren Untereinheiten ordnen sich mit zunehmender Zeitkonstante der Aktivierung (τ_{act}) folgendermaßen an: HCN1<HCN2<HCN3<HCN4 (Moosmang et al. 2001).

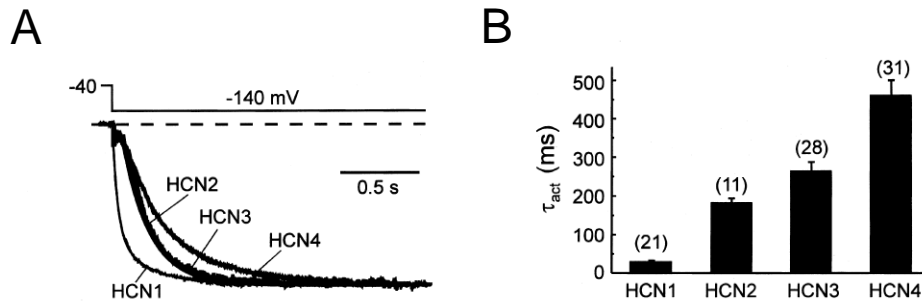


Abbildung 1.2 Die Spannungsabhängigkeit und die Aktivierungskinetik der einzelnen Untereinheiten

A Beispielströme zeigen die charakteristische Aktivierungskinetik der unterschiedlichen HCN-Untereinheiten. Wobei die HCN1-Untereinheit die schnellste Zeitkonstante besitzt. Hierfür wurde zunächst ein Haltepotential von -40 mV (HCN-Kanal geschlossen) angelegt und anschließend ein Spannungssprung zu -140 mV durchgeführt. Diese Veränderung der Spannung zu einem negativen Potential führt zu einer Öffnung des Kanals mit entsprechender Zeitkonstante τ_{act} , die sich für die einzelnen Untereinheiten unterscheidet. **B** Die grafische Darstellung der in A durchgeführten Messungen zeigt die durchschnittliche Zeitkonstante τ_{act} innerhalb der Gruppe der HCN-Untereinheiten. Hierbei ordnen sich die Untereinheiten in folgender Weise nach ihrer Geschwindigkeit an: HCN1 < HCN2 < HCN3 < HCN4 (Moosmang et al. 2001).

In der Literatur sind bereits einige Substanzen beschrieben, die als Blocker der Ionenpermeation durch Kanäle der HCN-Familie fungieren können. Neben verschiedenen Substanzen ist auch das monovalente Kation Cäsium in der Lage, alle HCN-Kanäle fast vollständig konzentrationsabhängig zu blockieren (DiFrancesco, 1982). So ist der Block jedoch auch auf eine Art spannungsabhängig, da Cäsium bei hyperpolarisierenden Potentialen einen größeren Effekt auf die Blockade des HCN-Kanals aufweist (DiFrancesco 1982). Weitere in Geweben nachgewiesene HCN-Kanalblocker sind Alinidin (Opthof et al. 1986, sinuatriale Zellen), Falipamil (Lillie und Kobinger 1984; Lillie und Kobinger 1987, sinuatriale Zellen), Zatebradin (Goethals, Raes und van Bogaert 1993, Neurone des Spinalganglions), Cilobradin (Raes et al. 1998, Neurone des Spinalganglions) und ZD7288 (BoSmith, Briggs, und Sturgess 1993, sinuatriale Zellen). Mit den Ausnahmen von ZD7288 und Alinidin sind alle Substanzen Derivate des Kalziumkanalblockers Verapamil und haben in sinuatrialen Zellen einen verlangsamenden Effekt auf die Kontraktionsfrequenz.

1.2.2 Expressionsmuster und Funktion von HCN-Kanälen

HCN-Kanäle kommen bevorzugt in erregbaren Zellen des neuronalen und kardialen Gewebes vor. Entsprechend ihres Expressionsgewebes hat der Strom, der durch die HCN-Kanäle fließt, einen spezifischen Namen. Der HCN-Strom im Herzen wird als I_f für „funny current“ bezeichnet, zurückzuführen auf sein atypisches Verhalten bei einer Hyperpolarisation zu öffnen (Halliwell und Adams 1982). Im Gehirn werden Ströme, die durch den HCN-Kanal fließen, als I_h für „hyperpolarized (hyperpolarisiert)“ bezeichnet.

Der Strom I_q für „queer (seltsam)“ beschreibt den HCN-Strom durch die Pyramidenzellen des Hippokampus (Halliwell und Adams 1982).

HCN2 und HCN4 sind vorherrschend im Herzen exprimiert, wobei sich ihre Expressionsmuster unterscheiden und HCN4 die prädominante Untereinheit im Sinusknoten ist (Ishii et al. 1999; Shi et al. 1999). Dort haben sie die Funktion, die Membran während der diastolischen Depolarisation des Aktionspotentials, zu depolarisieren und somit die Spontanaktivität anzuregen (Altomare et al. 2003; DiFrancesco 1993). DiFrancesco (2006) beschrieb, dass durch die Modulation der cAMP-Konzentration mittels Sympathikus und Parasympathikus, die Herzschlagrate kontrolliert werden kann. Die Beschleunigung der Herzschlagrate wird über den Sympathikus gesteuert. Durch das Binden von Noradrenalin an den G_s -Protein gekoppelten β_1 -Rezeptor wird die Adenylatzyklase stimuliert und die cAMP-Konzentration steigt. Parasympathisch wird die Herzfrequenz durch Acetylcholin reguliert, welches an den G_i -gekoppelten M_2 -Rezeptor bindet und somit die Adenylatzyklase hemmt (DiFrancesco 2006). Als weiteres Beispiel für eine gewebespezifische Expression sind die retinalen Photorezeptoren zu nennen, insbesondere die Stäbchen und Zapfen (Baylor, Matthews und Nunn 1984; Fain, Quandt und Bastian 1978). Neben den dort für die Sinneswahrnehmung benötigten CNG-Kanälen (nicht selektive Kationenkanäle, die durch cAMP und cGMP moduliert werden) (Kaupp und Seifert 2002), ist von den HCN-Kanaluntereinheiten die HCN1-Untereinheit dominant exprimiert. Sie ist essentiell für die Wahrnehmung von Helligkeit und Dunkelheit (Jeon, Strettoi und Masland 1998).

In-Situ-Hybridisierungen in Gehirnschnitten von Mäusen lieferten durch die Bestimmung des jeweiligen mRNA-Levels bereits erste Erkenntnisse über das Vorkommen der einzelnen HCN-Untereinheiten in unterschiedlichen Hirnregionen. Diese sind in der folgenden Tabelle 1.1 dargestellt. Die Expression der Untereinheiten im Gehirn ist hierbei stark vom untersuchten Areal abhängig. Während zum Beispiel im Thalamus und Hirnstamm die HCN2-Untereinheit dominant exprimiert ist, so ist die HCN1-Untereinheit im Cerebellum, insbesondere der Molekularschicht, die vorherrschende Untereinheit. Analog zum Herzen haben die HCN-Kanäle auch in Neuronen eine Schrittmacherfunktion für die Aktionspotentialfrequenz (Craven und Zagotta 2006).

In Tabelle 1.1 ist zu erkennen, dass insbesondere die HCN3-Untereinheit nur eine sehr niedrige bis gar keine Expression im Gehirn aufweist. Sie weist ebenfalls eine nur geringfügige Expression im Herzen auf, konnte dafür jedoch als einzige in Leber und Niere nachgewiesen werden (Santoro et al. 1998). Es handelt sich um die am geringsten erforschte Untereinheit.

Gehirnregion	mHCN1	mHCN2	mHCN3	mHCN4
Riechkolben	++	++	+	++
Neocortex	+++	++	+/-	+/-
Piriformer Cortex	++	++	+/-	+
CA1 Region	+++	++	+/-	+
CA2 Region	+	++	+/-	+
CA3 Region	++	++	+/-	+
Granulazelllayer	-	+	+/-	+
Polymorpher Layer	++	+	+/-	-
Thalamokortikale Relaiszellen	+/-	+++	+/-	++
Nuclei intralaminare	+/-	++	+/-	++
Striatum	-	+/+++	+/-	+/-
Amygdala	+/-	++	+/-	+
Hypothalamus	+/-	+	+/-	+/-
Colliculi superiores	+++	++	+/-	+/-
Colliculi inferiores	+	++	+/-	+
Molekularschicht	+++	-	+/-	+/-
Purkinjefaserzellschicht	++	+	+/-	+/-
Granulazelllayer	+	++	+/-	+/-
Gehirnstamm	-	+++	+/-	+/-

Tabelle 1.1 Übersicht über die Expression der HCN-Untereinheiten im Gehirn der Maus

Modifiziert nach Moosmang et al. 1999; +++ starke Expression, ++ moderat, + niedrig, - keine Expression

1.2.3 Diskrepanz zwischen nativen und heterolog exprimierten HCN-Kanälen

Nativ gemessene HCN-Ströme unterscheiden sich in ihren Eigenschaften (z.B. Spannungsabhängigkeit, Aktivierungskinetik) von denen, die in heterologen Systemen, wie zum Beispiel in *Xenopus laevis* Oozyten, nach Überexpression gemessen werden. So ergaben sich bei Untersuchungen in einem heterologen System, welches gleichermaßen die HCN1- und HCN4-Untereinheit exprimierte, deutliche Unterschiede zu Messungen, die in sinuatrialen Zellen von Kaninchen durchgeführt wurden (Altomare et al. 2003). Eine Erklärung für diese Unterschiede ist, dass HCN-Kanäle nicht nur als Homomere vorliegen, sondern dass bei der Ausbildung des Tetramers, verschiedene HCN-Untereinheiten beteiligt sein können. (Altomare et al.

2003; Moroni et al. 2000). Somit könnten gewebespezifische Unterschiede in Expressionsmustern der einzelnen HCN-Untereinheiten einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Heteromers und damit die Stromeigenschaften haben (Altomare et al. 2003). Jedoch können nicht alle Unterschiede lediglich mit einer Heteromerisierung der HCN-Untereinheiten erklärt werden, sodass eine weitere Hypothese aufgestellt wurde. Liganden, zelluläre Substrate oder Untereinheiten, können an die HCN-Kanäle binden und die Stromeigenschaften des I_f -Stromes im Gewebe modulieren. So konnten auch Unterschiede im Bereich des Membranpotentials, bei dem die halbmaximale Aktivierung des HCN-Stroms erreicht wird, mit Hilfe der „Inside-Out“-Technik beobachtet werden. Bei solchen Messungen des nativen I_f zeigte sich, dass die Gabe von cAMP das Auswaschen der intrazellulären Komponenten nicht vollständig umkehren kann, sondern dass weiterhin eine Verschiebung der Spannung der halbmaximalen Aktivierung vorliegt (DiFrancesco und Mangoni 1994). Daher kann postuliert werden, dass es neben cAMP noch weitere Modulatoren des HCN-Kanals gibt, die an den Kanal binden und seine Stromeigenschaften modulieren. Neben den in „Inside-Out“-Experimenten gezeigten auswaschbaren Modulatoren können auch gebundene Proteine in Form von Untereinheiten den Kanal in seinen physiologischen Eigenschaften beeinflussen.

Diese Doktorarbeit umfasst daher im Wesentlichen die Charakterisierung eines neuen Interaktionspartners, welcher durch einen Hefe-Zwei-Hybrid Screen identifiziert wurde. Bei diesem Protein handelt es sich um das **Vesicle associated membrane associated Protein B** (VAPB), welches einen Einfluss auf die Stromamplitude des untersuchten HCN2-Kanals hat. Modulatoren können zusätzlich durch ihr charakteristisches Expressionsmuster eine gewebespezifische Modulation ermöglichen, welche die Unterschiede in den Stromeigenschaften in verschiedenen Geweben besser erklären. Diese Modulatoren werden im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

1.2.4 Modulatoren des HCN-Kanals

Diese Arbeit konzentriert sich auf vier der bisher bekannten Modulatoren der HCN-Kanal Familie: Das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP), das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), das minK-related Protein 1 (MiRP1), sowie das Protein Trip8b. PIP₂, cAMP und Trip8b haben gemeinsam, dass sie alle einen spezifischen Effekt auf die Spannungsabhängigkeit des HCN-Kanals haben.

Als erster Modulator des HCN-Kanals wurde cAMP beschrieben (DiFrancesco und Tortora 1991), basierend auf der Tatsache, dass die HCN-Kanal Familie eine Bindestelle für cAMP im C-Terminus hat, die so genannte „Cyclic nucleotide binding domain (CNBD)“ oder auch zyklische Nukleotid-Bindestelle. Diese ist in der Lage, cAMP zu binden und führt somit zu einer Verschiebung der $V_{1/2}$ zu mehr positiveren Potentialen (Zolles et al. 2006).

Ein weiterer wichtiger Modulator ist PIP_2 . Zolles *et al.* (2006) beschrieben PIP_2 als einen allosterischen Liganden, der das Öffnen der Kanalpore um circa +20 mV hin zu positiveren Potentialen verschiebt. PIP_2 interagiert über eine separate Bindestelle mit dem HCN-Kanal und nicht über die CNBD. Daher können sich die Effekte des cAMP und die des PIP_2 akkumulieren, sodass, wenn beide Liganden präsent sind, eine Verschiebung um bis zu +40 mV in Richtung positiver Potentiale möglich ist (Zolles et al. 2006).

Bei Trip8b handelt es sich, im Gegensatz zu den beiden anderen Modulatoren, um einen Protein-Interaktionspartner und es kann daher als auxiliäre Untereinheit gesehen werden. Die Interaktion des Trip8b und des HCN-Kanalproteins erfolgt über den C-Terminus des HCN-Kanal-Proteins. Die Expression von Trip8b ist auf das Gehirn beschränkt (Santoro, Wainger und Siegelbaum 2004) und unterliegt dem alternativen Spleißen. Die durch das Spleißen entstandenen verschiedenen Isoformen reduzieren oder vergrößern die Stromamplitude des HCN1-Kanals. Dies wird durch eine Veränderung der Oberflächenexpression oder durch eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung hin zu mehr negativen Potentialen vermittelt (Santoro et al. 2009).

Ein weiterer Modulator ist das minK-related Protein 1 (MiRP1). Yu *et al.* (2001) konnten zeigen, dass die akzessorische β -Untereinheit MiRP1 ebenfalls mit dem HCN-Kanal interagieren kann. Sie wiesen eine Expression von MiRP1 hauptsächlich im Herzen, insbesondere im Bereich des Sinusknotens nach. Es verfügt lediglich über eine Transmembrandomäne und ist in der Lage, die Stromamplitude des HCN1- und HCN2-Kanals deutlich zu erhöhen. Zusätzlich beschleunigt es die Aktivierungskinetik der beiden Untereinheiten HCN1 und HCN2 (Yu et al. 2001). Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass MiRP1 ebenfalls mit der HCN4-Untereinheit interagiert. Die HCN4-Stromamplitude wird erhöht, jedoch verlangsamt sich die Aktivierungskinetik und die $V_{1/2}$ ist um circa -10 mV hin zu negativeren Potentialen verschoben (Decher et al. 2003).

1.2.5 Bekannte Mutationen der HCN-Kanal Familie

Aufgrund der Relevanz der HCN-Kanäle bei den zuvor beschriebenen zellulären Prozessen, können Mutationen in essentiellen Strukturen des HCN-Kanals zu einer Störung in der Funktion führen. Führt die Veränderung der Aminosäuresequenz zu einer Veränderung der Sekundär- oder Tertiärstruktur, so kann diese zwei Effekte auf die Funktion des Proteins haben. Zum einen den Gewinn an Funktion („Gain of function“), zum anderen einen Funktionsverlust („Loss of function“). Ein Beispiel für einen „Gain of function“ ist eine Stromamplitudenerhöhung während ein „Loss of function“ sich zum Beispiel durch eine geringere Einzelkanalleitfähigkeit des Ionenkanals bemerkbar macht. Sowohl „Knock-Out“-Tiere, d.h. das Gen wurde in diesen Tieren „ausgeschaltet“, als auch Mutationen eines Ionenkanals können Hinweise auf deren Funktion und Funktionsweise geben, aber auch mögliche Effekte aufzeigen, die ein Modulator auf den Kanal haben kann. Ist die Funktion des Modulators beispielsweise gestört, kann das massive Effekte auf die Kanaleigenschaften haben. Es können somit Phänotypen auftreten, die große Ähnlichkeiten mit einem „Knock-Out“ oder Funktionsgewinn oder -verlust durch Mutation aufweisen. In der Literatur (Herrmann et al. 2007) sind bereits mehrere Mutanten in der HCN-Kanal Familie beschrieben und auch Experimente an „Knock-Out“-Tieren durchgeführt worden. Eine Übersicht über den Einfluss eines „Knock-Outs“ ist in Tabelle 1.2 dargestellt.

Unter-einheit	Expression		Phänotyp	
	Gehirn	Herz	Gehirn	Herz
HCN1	Hippocampus, Purkinje Zellen, Neocortex	Sinusknoten	Eingeschränktes motorisches Lernen, Steigerung der Lernfähigkeit und des Gedächtnisses	–
HCN2	ubiquitär	ubiquitär	Ataxie, Absence Epilepsie	Sinusarrhythmie
HCN3	Riechkolben, Hypothalamus, Leber, Niere	–	–	–
HCN4	Thalamus, Riechkolben,	Sinusknoten, Purkinje Fasern, AV-Knoten	–	embryonale Letalität und Bradykardie, nicht funktionelle Schrittmacherzellen wiederholende Sinuspausen Bradykardie, QT-Zeit Verlängerung

Tabelle 1.2 Übersicht über die HCN-„Knock-Outs“ und deren Auswirkungen

Zusammenfassung der Expressionsmuster der einzelnen HCN-Untereinheiten und deren Phänotyp nach dem „Knock-Out“ modifiziert nach Herrmann, Stieber, und Ludwig (2007)

HCN1 „Knock-Out“-Mäuse

Die Lebensfähigkeit und Sterblichkeitsrate der Mäuse werden nicht durch einen globalen „Knock-Out“ des HCN1-Proteins beeinflusst. Außerdem können Wildtyp-Tiere weder anhand ihres Gesundheitszustands noch ihrer Gehirnanatomie von den „Knock-Out“-Tieren unterschieden werden (Herrmann et al. 2007). Abhängig von den betroffenen Neuronen hat ein „Knock-Out“ des HCN1-Kanals unterschiedliche Auswirkungen. So bewirkt der Verlust des Proteins in hippokampalen CA1-Neuronen eine Verlängerung der Langzeit-Potenzierung (LTP) und damit eine Verbesserung des Lernens und des Gedächtnisses (Nolan et al. 2004). Dahingegen führt in Purkinje Zellen des Cerebellums ein „Knock-Out“ zu Defiziten des Erlernens von motorischen Fähigkeiten, verursacht durch eine verringerte Frequenz der Aktionspotentiale dieser Neurone (Nolan et al. 2003).

HCN2 „Knock-Out“-Mäuse

Im Gegensatz zu den HCN1 „Knock-Out“-Tieren können die HCN2-defizienten Tiere leicht von den Wildtyp-Tieren unterschieden werden. Sie zeigen eine geringe Aktivität, haben einen unkoordinierten Gang, weitere zusätzliche neuronale Defizite und einen kardialen Phänotyp (Herrmann et al. 2007). Der kardiale Phänotyp äußert sich in Form einer Störung des Sinusrhythmus. Verursacht wird dies durch eine Verlangsamung der diastolischen Depolarisation, aufgrund der Verringerung der I_f -Stromamplitude im Sinusknoten. Neuronale Symptome äußern sich in Form von Absence Epilepsien mit entsprechendem Bewusstseinsverlust. Ursächlich hierfür ist eine hyperpolarisierende Verschiebung des Ruhemembranpotentials zu negativeren Potentialen, aufgrund des vollständigen Verlusts des I_h in thalamokortikalen Interneuronen (Ludwig et al. 2003).

HCN3 „Knock-Out“-Mäuse

HCN3^{-/-}-Mäuse weisen einen kardialen Phänotyp in Form einer verlängerten QT-Zeit bei niedrigen Frequenzen auf (Fenske et al. 2011). Fenske *et al.* konnten diesen Phänotyp bei hohen Frequenzen jedoch nicht beobachten. Die Verlängerung der QT-Zeit beruht auf einer veränderten Morphologie der T-Welle, die sich durch dessen Erhöhung der Amplitude auszeichnet. Dies konnte auf eine verkürzte Aktionspotentialdauer in den epikardialen Myozyten der HCN3-„Knock-out“-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistertieren zurückgeführt werden (Fenske et al. 2011).

HCN4 „Knock-Out“-Mäuse und Mutationen

Es konnte gezeigt werden, dass ein HCN4 „Knock-Out“ für Embryonen der Mäuse letal wirkt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der HCN4-Kanal essentiell während der Entwicklung des kardialen Reizleitungsgewebes ist (Stieber et al. 2003). Eine Blockade des HCN4-Kanals in adulten Tieren weist nur einen minimalen Effekt auf, welcher sich durch das Auftreten von Sinuspausen auszeichnet (Stieber et al. 2006). Eine Reduktion der Herzfrequenz, wie bei zuvor untersuchten Embryonen, konnte nicht beobachtet werden (Stieber et al. 2003). Die vier bisher beschriebenen HCN4-Mutationen zeigen unterschiedliche Effekte auf die Stromeigenschaften. Während sich die Mutation D553N durch einen „Gating“-Defekt, der über den C-Linker vermittelt wird, beschreiben werden kann (Netter et al. 2012; Ueda et al. 2004), so ist die Mutation HCN4-573X durch eine fehlende cAMP-Modulation gekennzeichnet (Schulze-Bahr et al. 2003). Die Mutationen S672R und G480R führen zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung zu negativeren Potentialen (Milanesi et al. 2006; Nof et al. 2007).

1.3 Vesicle associated membrane associated protein B (VAPB)

Das VAPB-Protein gehört zur Familie der „VAMP-associated protein“ (VAP)-Proteine, die in die Kategorie der Typ II Integralproteine eingeordnet werden (Skehel, Fabian-Fine und Kandel 2000). Typ II Integralproteine zeichnen sich dadurch aus, dass sich ihr N-Terminus im Zytosol befindet. Die Familie der VAP-Proteine besteht aus den Mitgliedern VAPA, VAPB und VAPC. Die Isoform VAPA wird separat durch ein Gen kodiert und weist wesentliche Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz auf (Nishimura et al. 1999). Es handelt sich hierbei um ein aus 244 Aminosäuren bestehendes Protein mit circa 33 kDa. Als Erstes wurde ein Homolog aus *Alypsia californica* kloniert und das Protein wurde als VAP-33 bezeichnet (Skehel et al. 1995). VAPB und VAPC werden lediglich durch ein Gen kodiert und weisen daher eine hohe Homologie ihrer Aminosäuresequenz auf. VAPB hat 243 Aminosäuren und eine hohe Übereinstimmung (60%) der Sequenz zur Isoform VAPA. Das VAPC-Protein ist eine verkürzte Form des VAPB-Proteins, das durch alternatives Spleißen entsteht. Die ersten 70 Aminosäuren der beiden Isoformen sind identisch, jedoch gefolgt von 29 Aminosäuren, die keine Übereinstimmung zeigen (Nishimura et al. 1999).

1.3.1 Struktur und Aufbau der VAP-Familie

Die Mitglieder der VAP-Familie unterscheiden sich in ihrem Aufbau voneinander. Das VAPA- und VAPB-Protein haben einen ähnlichen Aufbau, während es sich bei dem VAPC-Protein um ein zytosolisches Protein handelt. In Abbildung 1.3 ist der Aufbau der Homologen VAPA und VAPB schematisch dargestellt.

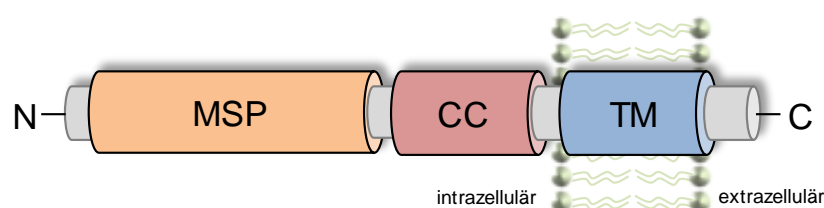


Abbildung 1.3 Aufbau des VAPA- und VAPB-Proteins

Schematischer Aufbau des VAPA und VAPB-Proteins. Sie verfügen über drei Domänen: Major sperm Domäne (MSP), Coiled-Coiled Domäne (CC) und die Transmembrandomäne (TM). Der N-Terminus liegt zytosolisch, während der C-Terminus extrazellulär vorliegt.

VAPA und VAPB können in drei Domänen untergliedert werden. Die „Major sperm Domäne“ (MSP), die „Coiled-Coiled Domäne“ (CC) und die „Transmembrandomäne“ (TM). Die Proteine der VAP-Familie gehören zur Familie der Proteine, welche als „Single transmembrane proteins“ bezeichnet werden. Das heißt sie verfügen über eine Transmembrandomäne, die das Protein in der Membran verankert (Weir, Klip und

Trimble 1998). Die Transmembrandomäne enthält ein GXXXG-Motiv, welches eine Dimerisierung mit VAPB oder VAPA vermitteln kann (Lev et al. 2008). Aufgrund ihrer hohen Übereinstimmung zum „nematode major sperm protein“ des *Caenorhabditis elegans* erhielt die hochkonservierte MSP-Domäne ihre Bezeichnung (Lev et al. 2008). Sie ist in der Lage, mit einem FFAT-Motiv zu interagieren (Prosser et al. 2008). Das FFAT-Motiv steht für Diphenylalanin (FF) in einem sauren Milieu und ist ein Zielsignal, das Proteine an die zytosolische Membran des ER oder Zellkernmembran adressiert (Kaiser et al. 2005). Außerdem wird davon ausgegangen, dass auch dieses Motiv an der Dimerisierung beteiligt ist (Mitne-Neto et al. 2007). Zum anderen gibt es die zentrale Domäne mit einer amphipathischen helikalen Struktur, bezeichnet als CC-Domäne. Sie unterstützt die Bildung von Protein-Protein-Interaktionen und ist ein typisches Motiv in t-SNARES (Weimbs et al. 1997). Die Transmembrandomäne dient zur Dimerisierung von VAPA oder VAPB, sodass Heteromere oder Homomere entstehen (Lev et al. 2008). Die VAPC-Isoform unterscheidet sich in ihrem Aufbau aufgrund einer Rasterschubmutation, welche zu einem Verlust von drei Exonen führt. Diese drei Exone kodieren für Teile der CC- und die Transmembrandomäne (Nishimura et al. 1999), sodass es sich bei VAPC um ein Protein des Zytosols handelt.

1.3.2 Interaktionspartner und Funktion, sowie Expressionsmuster der VAP-Proteine

VAP-Proteine haben verschiedene Funktionen von physiologischer Bedeutung. So sind sie maßgeblich an der Regulation der Neurotransmitter-Ausschüttung in Nervenzellen beteiligt (Skehel et al. 1995) und somit essentiell für die Generierung von so genannten postsynaptischen Potentialen (EPSPs) (Skehel et al. 2000). Außerdem sind sie für den ER-Golgi Transport, sowie den Transport innerhalb des Golgi-Apparats verantwortlich (Peretti et al. 2008) und stabilisieren zusätzlich das präsynaptische Mikrotubuli-Netzwerk (Pennetta et al. 2002). VAP-Proteine beeinflussen das „Trafficking“, das heißt den Transport und Adressierung von bestimmten Proteinen an die Membran, so zum Beispiel des GLU4 Transporter-Proteins (Foster et al. 2000). Um all diese Funktionen zu erfüllen, sind Interaktionspartner notwendig, die diese Funktionen unterstützen oder vermitteln. Aufgrund der Vielzahl von beschriebenen Interaktionspartnern für die Proteine der VAP-Familie, werden in dieser Arbeit nur einige der Interaktionspartner genauer betrachtet. Eine Liste der derzeitigen bekannten Interaktionspartner kann jedoch der nachfolgenden Tabelle entnommen werden (Lev et al. 2008).

Identifizierter Interaktionspartner	Vermittelndes VAP-Protein	Interaktionsstelle
SNARE Komplex Proteine		
VAMP-1	VAPA	MSP und TM
VAMP-2	VAPA	
Syntaxin 1A	VAPA	
bet1	VAPA	
sec22	VAPA	
α -SNAP	VAPA	
NSF	VAPA	
Virale Proteine		
P48	VAPA	
NS5A HCV nonstructural (NS) protein	VAPB	CC
NS5A	VAPA	CC und TM
NS5B	VAPA	MSP
FFAT Proteine über MSP Domäne		
Opi1p	Scs2p (Hefe - VAPA)	
Osh1, Osh2, Osh3	Scs2p (Hefe)	
OSBP	VAPA	
ORP1–4, 6, 7, 9	VAPA(B)	
CERT	VAPA/B	
Nir1, Nir2, Nir3	VAPB(A)	
Andere Proteine		
VAPA/B	VAPA/B	Hetero-/Homo-dimerisierung über TM
Occludin	VAPA	
Insig1, Insig2	VAPA/B	
Tubulin	DVAP33 (Drosophila)	
PRA2	VAPA	
PP2C ϵ	VAPA	TM
Stt4p, Fks1p, Num1p, Rpn10p, YGR086Cp	Scs2p (Hefe)	

Tabelle 1.3 Übersicht über die beschriebenen Interaktionspartner der VAP-Proteine

Die Tabelle wurde modifiziert nach Lev *et al.* (2008) und enthält eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Interaktionspartner der VAP-Proteine. Die Tabelle ist in Gruppen eingeteilt. Zum einen die Interaktionspartner, die ebenfalls am SNARE Komplex beteiligt sind. Zum anderen virale Proteine oder Proteine, deren Interaktion über ein FFAT-Motiv und die MSP Domäne des VAPA/B-Proteins erfolgt. Im letzten Abschnitt sind Proteine verschiedener Funktion aufgelistet, die ebenfalls mit den VAP-Proteinen interagieren.

In einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde das VAP-33-Protein (Homolog des humanen VAPA) entdeckt und als Interaktionspartner des Synaptobrevin (VAMP2) identifiziert. (Skehel *et al.* 1995). VAMP-Proteine sind an der Ausbildung des SNARE-Komplexes und somit an der Exozytose von Vesikeln beteiligt (Schoch *et al.* 2001). SNARE steht für “**S**oluble **NSF**(N-ethylmaleimide-sensistive fusion protein)-**A**ttachment protein **RE**ceptor“. NSF ist eine AAA ATPase (**ATP**ases **A**ssociated with a variety of cellular **A**ctivities), die ein essentieller Bestandteil des SNARE-Komplexes ist. Sie liefert die notwendige Energie, um den SNARE-Komplex wieder aufzulösen (Furst *et al.* 2003). Ein weiterer

Interaktionspartner von VAPA ist Syntaxin 1A, welches ebenfalls Teil des SNARE-Komplexes ist. VAP-Proteine übernehmen somit eine wesentliche Rolle bei der Exozytose. Sie bilden das Bindeglied zwischen dem SNARE-Komplex, den Mikrotubuli mittels Tubulin (Skehel et al. 2000) und den Lipid-Transfer Proteinen (LTP) via FFAT-Motiv (Lev et al. 2008). In der folgenden Abbildung 1.4 ist der Zusammenhang schematisch dargestellt.

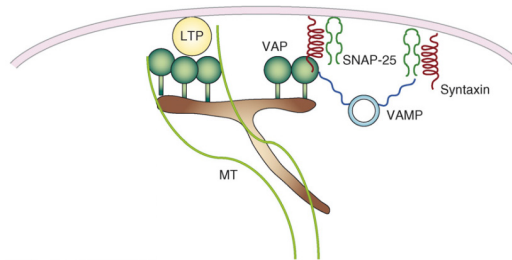


Abbildung 1.4 Bedeutung der VAP-Proteine im SNARE-Komplex (modifiziert nach Lev et al. 2008)

Schematische Darstellung des SNARE-Komplexes mit seinen Bestandteilen VAMP (Synaptobrevin, blau), Syntaxin (rot), SNAP-25 (grün) der zur Vesikelfusion an der Membran (rosa) benötigt wird. Die VAP-Proteine (grün) sind die Bindeglieder zwischen dem ER (braune Struktur) und den Mikrotubuli (MT, hellgrün) und den Lipid-Transfer Proteinen (LTP, gelb). VAP-Proteine könnten lokal die Vesikelfusion durch die Interaktion mit dem SNARE-Komplex regulieren. Zusätzlich könnten sie den Lipidtransport durch die Interaktion mit LTPs beeinflussen, sowie das Membran-„Trafficking“ modulieren und das Zytoskelett durch die Interaktion mit den Mikrotubuli stabilisieren.

Die „Membrane-associated Phosphatidylinositol Transfer Proteine“ (Nir) sind Beispiele für die bereits genannten Interaktionspartner des VAPA via FFAT-Motiv. Sie haben die Fähigkeit, Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin zwischen Doppelmembransichten zu transferieren. VAP-Proteine sind ubiquitär exprimiert und sind innerhalb der Zellen im Wesentlichen im Kompartiment des ERs zu finden (Amarilio et al. 2005). Das exakte Expressionsmuster der VAP-Proteine in verschiedenen Geweben wurde bisher jedoch unzureichend untersucht.

1.3.3 Mutationen der VAP-Protein Familie

Innerhalb der VAP-Familie wurden lediglich für VAPB human pathogene Mutationen beschrieben. Mutationen des VAPB stehen im direkten Zusammenhang mit der amyotrophen Lateralsklerose 8 (ALS8) (Nishimura et al. 2004). Bei ALS handelt es sich um eine neurodegenerative Krankheit, die durch eine fortschreitende Muskelatrophie und eine gleichzeitige Degeneration der Motoneurone des Rückenmarks gekennzeichnet ist (Kiernan et al. 2011; Mitchell und Borasio 2007). Die Folgen sind Muskelschwäche, Faszikulationen, Sprach- und Schluckbeschwerden, sowie fortschreitende Lähmung. Mehrere Mutationen wurden in diesem Zusammenhang beschrieben. Aufzuzählen sind VAPB-P55S, VAPB-T46I, VAPB-A145V und VAPB-S160del. Nach derzeitigem Kenntnisstand spielt die Punktmutation VAPB-P56S, bei der

die Aminosäure Prolin durch ein Serin ersetzt wurde, eine wesentliche Rolle in der Entwicklung des Krankheitsbildes (Kabashi et al. 2013; Kanekura et al. 2006). Die Punktmutation in der MSP-Domäne führt zu einer Aggregation des Proteins und somit zu einem Funktionsverlust (Kabashi et al. 2013). Zur genaueren Untersuchung der P56S Mutation wurden transgene Mäuse generiert. Das VAPB-P56S wird in diesem Fall durch einen neuronalen Promotor kontrolliert, sodass lediglich neuronales Gewebe von der Mutation betroffen ist. In Folge einer Degeneration der kortikospinalen Motoneurone entwickelten diese Mäuse fortschreitende Hyperaktivität und andere motorische Abnormitäten, wie Defizite in der Koordination und Körperbalance (Aliaga et al. 2013). Eine weitere Mutation innerhalb der konservierten MSP-Domäne ist T46I. In *Drosophila melanogaster*-Experimenten bildet VAPB-T46I, wie VAPB-P56S, Aggregate aus. Durch die Mutation kommt es zusätzlich zu einer Deorganisation des ER sowie einer vermehrten Bildung von Chaperonen in Neuronen und Muskeln (Chen et al. 2010). Die Mutationen A145V und die S160del wurden durch ALS-Patienten Screens identifiziert. Bei der Mutation S160del gibt es lediglich einen Verlust eines Serins (Kabashi et al. 2013).

Neben den transgenen P56S Mäusen wurden weitere Ansätze gewählt, um die Relevanz des VAPB-Proteins für die Entstehung der ALS festzustellen. Für diese Zwecke wurden zwei verschiedene Tiermodelle gewählt. Zum einen wurde ein Zebrafisch „Knock-Down“ mittels Morpholino-Injektion und zum anderen ein kompletter „Knock-Out“ des VAPB-Proteins im gesamten Organismus von Mäusen durchgeführt. Für den „Knock-Down“ in Zebrafischen werden synthetisierte Oligonukleotide verwendet, die komplementär zur Ziel-RNA sind. Dies führt zu einem Abbau der RNA und somit einer fehlenden Translation des Zielproteins. Zebrafische zeigten einen neuronalen Phänotyp in Form von motorischen Defiziten, die sie in ihrer Schwimffähigkeit einschränkten. Ein kompletter ALS-Phänotyp konnte jedoch nicht erreicht werden, weder durch einen „Knock-Down“ noch durch eine Überexpression der Mutationen des VAPB-Proteins. Die generierten VAPB „Knock-Out“-Mäuse wiesen jedoch keinen ALS-typischen Phänotyp auf, sondern lediglich eine milde und altersabhängige Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten. Dies lässt lediglich den Schluss zu, dass ein Funktionsverlust des VAPB das motorische System zwar schwächt, jedoch das veränderte VAPB-Protein nicht alleine in der Lage ist, einen vollständigen ALS Phänotyp herbeizuführen (Kabashi et al. 2013).

1.4 Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bibliothek-„Screen“ identifiziert VAPB als neuen Interaktionspartner des HCN2-Kanals

Ein vorherige Studie identifizierte das VAPB als neuen Interaktionspartner des HCN2-Proteins (Walecki 2011). Einige der durchgeführten Experimente werden in diesem Kapitel zusammengefasst und sollen eine Einführung geben. Diese Experimente waren die Grundbausteine für die weiterführenden Untersuchungen im Rahmen meiner Doktorarbeit.

1.4.1 cDNA-Bibliothek-„Screen“ nach möglichen Interaktionspartnern des HCN2-Kanals

Für die Identifikation neuer Interaktionspartner wurde das Split-Ubiquitin-Hefe-Zwei-Hybridsystem genutzt. Dieses System eignet sich besonders für Interaktionsstudien von Membranproteinen, da sich die Proteine im Gegensatz zu einem klassischen Hefe-Zwei-Hybridsystem nicht im Zellkern befinden müssen (Stagljar et al. 1998). Die Basis für dieses Experiment ist, dass das Protein Ubiquitin in zwei Hälften (Nub-X und CUB) gespalten ist. An jede dieser Hälften ist eines der Proteine gebunden, deren mögliche Interaktion untersucht werden soll. Ubiquitinasen (UBP) können die Spaltprodukte Nub-X und CUB nicht erkennen, sodass der an das CUB fusionierte Transkriptionsfaktor LexA nicht abgespalten werden kann. Lediglich wenn CUB und Nub-X miteinander interagieren, zum Beispiel aufgrund räumlicher Nähe der beiden gebundenen Proteine (HCN2 und cDNA Bibliothek-Protein), wird der Transkriptionsfaktor über Ubiquitinasen freigesetzt und kann im Zellkern zur Transkription von Reportergenen führen. Bei diesen Reportergenen handelt es sich nach Herstellerangaben (Mobictec) um Proteine zur Leuzin- und Tryptophansynthese, welche die Hefekclone befähigen, auf Minimalmedium zu wachsen.

Der „Screen“ der humanen cDNA-Bibliothek (Gehirn) nach potentiellen HCN2-Interaktionspartnern wurde mit einem N-terminal an das „CUB-Protein“ fusionierten HCN2-Konstrukt (Maus) durchgeführt. Eine cDNA-Bibliothek wird aus der mRNA des entsprechenden Gewebes hergestellt und enthält demnach die Gesamtheit aller Gene, die in diesem Gewebe exprimiert werden. Für den „Screen“ wurde eine an den N-Terminus des Nub-X Proteins fusionierte cDNA-Bibliothek der Firma „DualSystems“ verwendet. Eine vereinfachte Darstellung der Funktionsweise des Hefe-Zwei-Hybrid-„Screens“ mit der cDNA-Bibliothek ist in Abbildung 1.5 skizziert.

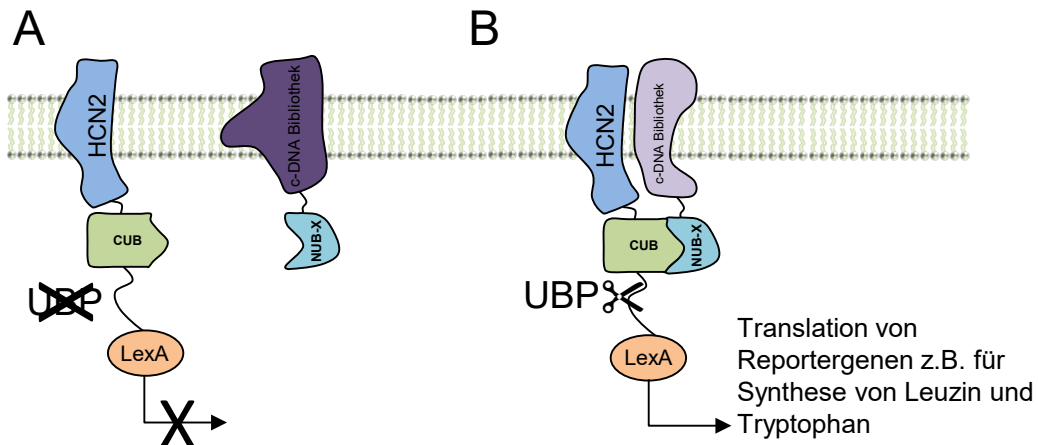


Abbildung 1.5 Funktionsweise des Split-Ubiquitin-Hefe-Zwei-Hybridsystems

Schematische Darstellung der Funktionsweise des Split-Ubiquitin Hefe-Zwei-Hybridsystems. Das System beruht auf der Interaktion des Cub und Nub-X Proteins, die bei einer Interaktion das Protein Ubiquitin bilden. **A** Bei einer fehlenden Interaktion zwischen dem zu untersuchenden Protein (HCN2) und einem nicht interagierenden Protein aus der cDNA-Bibliothek, gelangen das CUB und Nub-X nicht in ausreichende Nähe zueinander. Dies hat die Folge, dass kein vollständiges Ubiquitin gebildet wird, das durch UBPs erkannt wird und somit keine Translation der Reportergene stattfindet. **B** Erfolgreiche Interaktion zwischen dem Zielprotein HCN2 und einem Konstrukt aus der cDNA-Bibliothek führt zur Bildung von Ubiquitin. Dieses wird durch Ubiquitinasen (UBP) erkannt und der Transkriptionsfaktor LexA wird freigesetzt. Dies ermöglicht die Synthese von Reportergenen und hierdurch das Wachstum auf Minimalmedium.

Innerhalb dieses „Screens“ konnte das VAPB identifiziert werden (Abbildung 1.6). Der positive Hefeklon enthielt jedoch nicht die gesamte genetische Information des VAPB-Proteins, sondern lediglich einen Teil der CC-Domäne und die vollständige TM-Domäne.

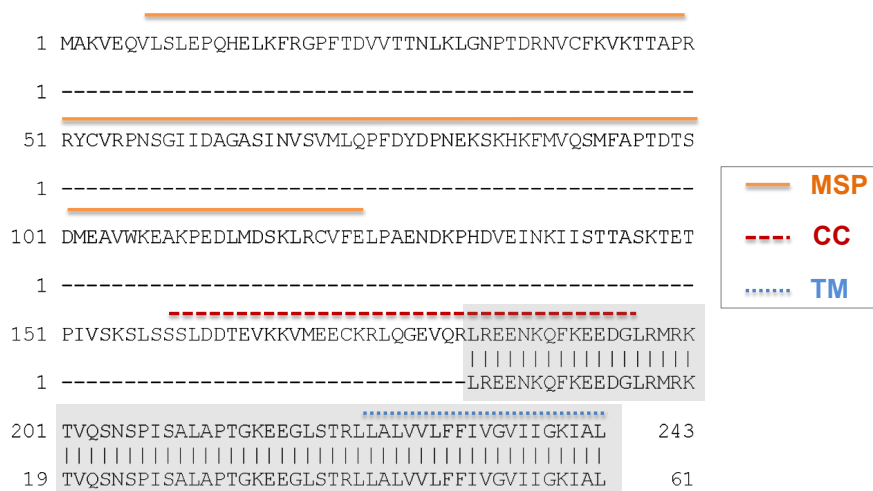


Abbildung 1.6 Aminosäuresequenz des VAPB-Proteins mit dem gefischten Bereich aus dem cDNA-Bibliothek-„Screens“

Vollständige Aminosäuresequenz des VAPB-Proteins mit den markierten Domänen. Orange: Major sperm Domäne (MSP); Rot: Coiled-Coil Domäne (CC); Blau: Transmembrandomäne (TM). Zusätzlich grau unterlegt ist der Bereich, der mittels des Split-Ubiquitin-„Screens“ der cDNA-Bibliothek identifiziert wurde. Dieser Bereich des VAPB-Proteins (fusioniert an das Nub-X) war im Experiment physikalisch in der Lage, mit dem HCN2-Protein (fusioniert am CUB) zu interagieren.

Anschließend konnte, mittels eines weiteren Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstest mit den vollständigen VAPB- und HCN2-Protein Sequenzen, eine Interaktion der beiden Proteine bestätigt werden (Abbildung 1.7).

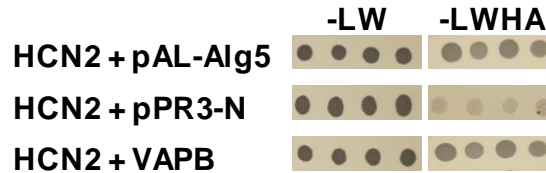


Abbildung 1.7 Nachweis der Protein-Protein Interaktion von HCN2 und VAPB (modifiziert nach Walecki 2011)

Hefe-Zwei-Hybrid Interaktionstest mit HCN2 und VAPB. Die oberste Versuchsreihe zeigt die Reaktion des HCN2 Konstrukts mit der Positivkontrolle (pAL-Alg5). Klar zu erkennen ist ein Hefewachstum auf Minimalmedium. Im Gegensatz zur Testreihe mit der Negativkontrolle (pPR3-N), bei der die Hefeklonen nicht wachsen. Beim Interaktionstest mit VAPB ist ein deutliches Hefewachstum auf Minimalmedium zu sehen und bestätigt hiermit die Interaktion der beiden Proteine in der Hefe.

1.4.2 Elektrophysiologische Untersuchungen der Modulation durch VAPB

Für die elektrophysiologischen Experimente wurden *Xenopus laevis* Oozyten mit 7,5 ng HCN2-cRNA und verschiedenen Konzentrationen des VAPB-Proteins ko-injiziert. Hierbei wurde beobachtet, dass die Stromamplitude bei den Konzentrationen 1 ng und 3 ng signifikant zunimmt, während sich eine Stromreduktion bei einer Ko-Expression mit 9 ng VAPB zeigte (Abbildung 1.8A). Innerhalb der HCN-Familie weist VAPB eine Selektivität auf. So ist es in der Lage, den HCN1-Kanal zu modulieren, jedoch nicht HCN4 (Abbildung 1.8B). Die fehlende Interaktion mit HCN4 konnte auch mittels Hefe-Zwei-Hybrid Experimenten nachgewiesen werden (Abbildung 1.8C). Experimente mit lediglich der Transmembrandomäne (VAPB-(TM)) zeigten eine Erhöhung der Stromamplitude bei einer Ko-Expression mit einer Konzentration von 1 ng (Abbildung 1.8D). Die Schlussfolgerung aus diesen Experimenten ist, dass das VAPB mit dem HCN2-Kanal mittels seiner Transmembrandomäne interagiert und die Stromamplitude des HCN1- und HCN2-Kanals durch das VAPB konzentrationsabhängig moduliert wird.

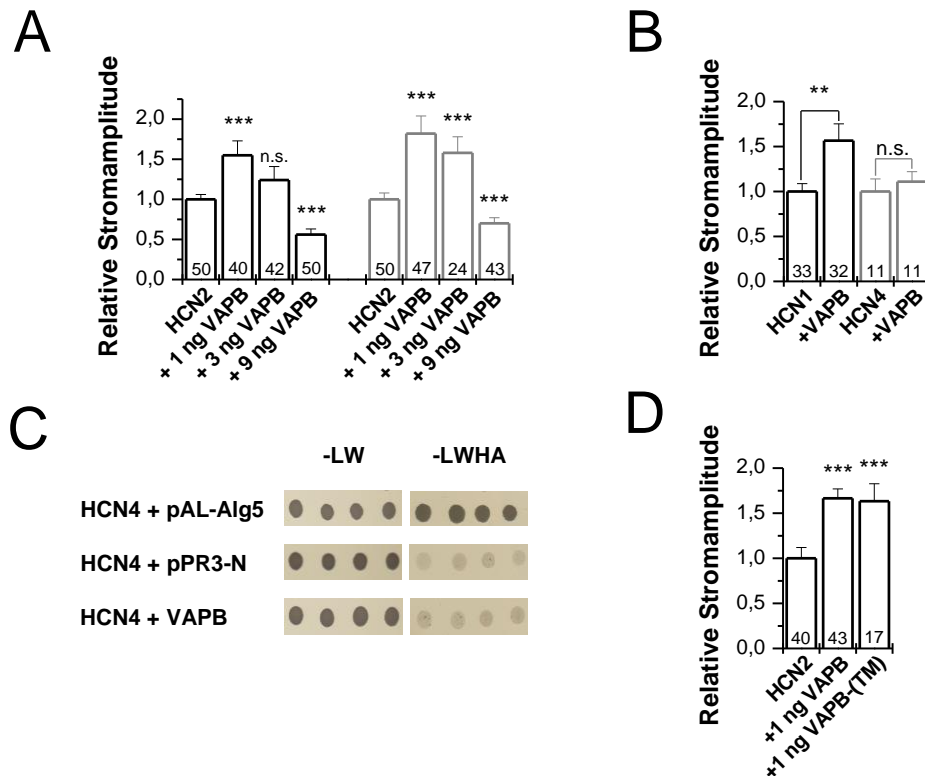


Abbildung 1.8 Modulation der Stromamplitude durch VAPB (modifiziert nach Walecki 2011)

A Ergebnisse der Stromamplitudenmessungen. VAPB führt zu einer Vergrößerung der Stromamplitude in den Konzentrationen 1 ng und 3 ng nach 24 Stunden (schwarz) und nach 48 Stunden (grau). Höhere Konzentrationen (9 ng) führen zu einer Stromreduktion. **B** Das VAPB moduliert den HCN1-Kanal, jedoch nicht den HCN4-Kanal in seiner Stromamplitude. **C** Hefe-Zwei-Hybrid Experimente zeigen eine fehlende Interaktion zwischen dem VAPB und dem HCN4-Kanal in der Hefe. **D** Die Transmembrandomäne des VAPB-Proteins vermittelt die Interaktion mit HCN2 und ist in der Lage, die Stromamplitude zu erhöhen.

1.4.3 Mechanismus der Interaktion des VAPB-Proteins mit dem HCN2-Kanal

Zur Charakterisierung der Bindungsstelle zwischen VAPB und dem HCN2-Kanal wurden TEVC-Messungen zur elektrophysiologischen Charakterisierung bei einer Ko-Expression mit dem VAPB-Protein mit einer HCN2 N-terminalen Trunktationsmutante (HCN2-NTK) durchgeführt. Der HCN2-NTK zeigte keinerlei Modulation der Stromamplitude durch das VAPB-Protein (Abbildung 1.9A). In der Studie wurde gezeigt, dass der HCN4-Kanal nicht in der Lage ist, mit dem VAPB-Protein zu interagieren und die Stromamplitude des Kanals zu vergrößern. Entsprechend wurde eine Chimäre aus einem N-Terminus des HCN4-Kanals und einem Abschnitt des HCN2-Kanals ab der ersten Transmembrandomäne bis zum Ende der Aminosäuresequenz ebenfalls untersucht (Abbildung 1.9B). Das VAPB-Protein konnte bei einer Ko-Expression in niedriger Konzentration die Stromamplitude dieser Chimäre nicht erhöhen.

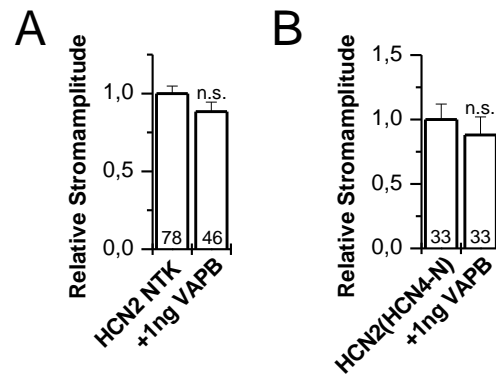


Abbildung 1.9 Mechanismus der VAPB Interaktion mit HCN2 (modifiziert nach Walecki 2011)

A VAPB kann bei fehlendem N-Terminus die Stromamplitude des HCN2-Kanals nicht mehr erhöhen. **B** Die Substitution des N-Terminus des HCN2 zu einem des HCN4 Kanals führt zu einer fehlenden Modulation des HCN-Stroms der Chimäre.

1.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit elektrophysiologischen und molekularbiologischen Techniken gezeigt werden, dass das VAPB-Protein ein Modulator des HCN2-Kanals ist. Ferner war es das Ziel, die physiologische Bedeutung dieser Modulation zu identifizieren und den Mechanismus der Modulation aufzuklären.

Zur Validierung der VAPB Interaktion mit dem HCN2-Kanal sollten zunächst weitere elektrophysiologische Experimente durchgeführt werden. Diese Versuche sollten weitere Schlüsse auf den Mechanismus der Interaktion zu lassen. Hierzu sollten neben dem Einfluss auf die Aktivierungskinetik, die Spezifität der Interaktion und den Einfluss des VAPB-Proteins auf die pharmakologischen Eigenschaften des HCN2-Kanals bestimmt werden. Zusätzlich sollten auch die Familienmitglieder der VAP-Proteine elektrophysiologisch charakterisiert werden, sowie die Interaktionspartner VAMP1 und VAMP2. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es, die indirekte und direkte Proteininteraktion des VAPB-Proteins mittels „GST-Pulldown“-Experimenten nachzuweisen. Hierzu sollten neben Zelllysaten aus Zellkulturzellen und Gewebelysaten auch eine *in vitro* Translation des HCN2-Proteins verwendet werden, um die direkte Interaktion nachzuweisen. Ein weiteres Ziel war es, den Einfluss des VAPB-Proteins auf die Verteilung von HCN2 in Säugetierzellen, insbesondere in Neuronen, zu untersuchen. In Bezug auf die Lokalisation galt es ebenfalls, mittels Chemilumineszenz-Assays den Einfluss des VAPB auf die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals zu ermitteln. Ein wesentlicher Anteil dieser Arbeit sollte sich jedoch mit der bisher unerforschten physiologischen Relevanz des VAPB auf den HCN2-Kanal beschäftigen. Insbesondere der mögliche kardiale Phänotyp, aufgrund der Relevanz von HCN-Strömen für die Herzschlagrate, sollte untersucht werden. Hierzu sollten die elektrophysiologischen Eigenschaften *in vitro* mit HL-1 Zellen untersucht und zusätzlich die physiologische Relevanz mit Hilfe der VAPB-„Knock-Out“-Maus aufgezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 Bakterienstämme

Je nach Anwendung wurden die DNA Plasmide zur Amplifikation von DNA in verschiedene Bakterienstämme transformiert und verwendet. Für eine klassische Transformation eines kleinen Plasmids (<4000 kb) wurden *Escherischia Coli* Zellen des Stammes DH5 α (Genotyp: F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -)) der Firma Invitrogen verwendet. Diese Zellen sind für eine Transformation mittels Hitzeschock geeignet. Für die Transformation größerer Plasmide oder Plasmide mit geringer Transformationseffizienz wurden elektrokompetente *Escherischia Coli* Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um den Stamm DH10B der Firma Invitrogen (Genotyp: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ -rpsL nupG)). Für die Proteinexpression der pGEX Konstrukte wurde ein weiterer Bakterienstamm (BL21 (DE3)) der Firma Stratagene genutzt (Genotyp: E. coli B F- dcm ompT hsdS(rB – mB –) gal λ (DE3)).

2.1.2 Kulturmedien für Bakterien

Für die Kultivierung der E.Coli Bakterien wurden verschiedene Medien und LB (lysogeny broth)-Platten verwendet. LB-Medium und LB-Agar (für die Platten) wurden aus Fertigpulvern nach Herstellerangaben abgewogen und mit ddH₂O gemischt (Roth). Für die BL21-Zellen wurde ein zusätzliches Medium verwendet. Dieses beinhaltet (pro 1 l) folgende Komponenten: 20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl in 1 l Wasser gelöst. Dieses Medium wird als SOB (Super Optimal Broth)-Medium bezeichnet. Es wird autoklaviert und anschließend vor Gebrauch mit filtersteriliertem 10 ml MgCl₂ (1 M), 10 ml MgSO₄ (1 M) und 10 ml Glucose (2 M) supplementiert und somit als SOC-Medium bezeichnet.

2.1.3 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika sind abhängig vom transformierten Plasmid und werden durch den Vektor bestimmt. In dieser Arbeit wurden folgende Antibiotika für Bakterien verwendet: Ampicillin (aus Pulver, Stammlösung in ddH₂O 100 mg/ml) und Kanamycin (aus Pulver, Stammlösung 100 mg/ml in ddH₂O). Die Endkonzentration des Ampicillins im LB oder SOC Medium war: 100 µg/ml, die Endkonzentration des Kanamycins: 50 µg/ml. Für Zellkulturzellen wurde das Antibiotikum Puromycin (Stocklösung 10 mg/ml, Invitrogen) mit einer Endkonzentration von 5 µg/ml im Zellkulturmedium verwendet.

2.1.4 Transformation der Plasmide mittels Hitzeschock

Die Transformation kleinerer Plasmide wurde mittels Hitzeschock unter der Verwendung von DH5α Zellen (Invitrogen) durchgeführt. Bei einer Transformation von Plasmid-DNA, die lediglich der Gewinnung neuer DNA diente, wurden 25 µl kompetente Zellen auf Eis mit 1 µl Plasmid-DNA vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 37°C für 1 Minute durchgeführt. Nach einer weiteren Inkubation für 2 Minuten auf Eis wurden die Bakterien auf LB-Agar Platten mit einem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert. Bei Transformation eines Ligationsansatzes (siehe Kapitel 2.1.10, Subklonierung) wurden 80 µl kompetente Zellen mit 10 µl Ligationsansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock bei 37°C für 2 Minuten unter leichtem Schütteln, der durch eine Inkubation für 2 Minuten auf Eis abgestoppt wurde. Für eine Vermehrung der Bakterien wurden 900 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und diese für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Um die Flüssigkeitsmenge für die Ausplattierung auf die LB-Agar Platten zu verringern, wird der Ansatz für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die verbliebene Restflüssigkeit (ca. 25 µl) zum Resuspendieren der Zellen verwendet. Die Suspension wurde anschließend auf die mit Antibiotika versetzten LB-Agar Platten verstrichen. Die Inkubation erfolgte bei beiden Techniken über Nacht (ü.N.) in einem Inkubator bei 37°C.

2.1.5 Transformation mittels Elektroporation

Für eine Transformation größerer Plasmide wurde die Technik der Elektroporation angewandt. Hierzu wurden 25 µl der elektrokompenten DH10B Zellen (Invitrogen) verwendet. Nach dem Auftauen wurden 0,5 µl des gewünschten Plasmids zugegeben und die Suspension in eine Elektroporationsküvette (bei -20°C gelagert) mit einem Elektrodenabstand von 2 mm überführt. Mittels des Elektroporationsgeräts

(MicroPulser von Biorad) wurde ein kurzer elektrischer Impuls gegeben. Direkt nach dem Elektroschock wurde 1 ml SOC Medium hinzugefügt und die Zellsuspension in ein Eppendorf Gefäß überführt. Der Ansatz wurde anschließend für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Gewinnung einzelner Bakterienkolonien wurden lediglich 200 µl der Zellsuspension auf die LB-Agar Platten (mit Selektionsantibiotikum) ausplattiert. Die Inkubation der LB-Agar Platten erfolgte ü.N. bei 37°C.

2.1.6 Transformation der BL21 (DE3) Zellen

Für eine Proteinexpression (verwendet in GST-„Pulldowns“ siehe Kapitel 2.1.8 und 2.1.19) musste das gewünschte Plasmid (Plasmide für GST-„Pulldown“ siehe Kapitel 2.1.24) in die BL21 Zellen eingebracht werden. Hierzu wurden 100 µl kompetente Zellen mit 1,7 µl β-Mercaptoethanol gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Den für die Transformation präparierten BL21 Zellen wurden 1- 50 ng der gewünschten Plasmid DNA zugegeben und es folgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Für den anschließenden Hitzeschock wurde das SOC Medium auf 42°C vorgewärmt. Der Hitzeschock erfolgte für 45 Sekunden bei 42°C, mit anschließender Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Nach dem erfolgten Hitzeschock wurden 900 µl erwärmtes SOC Medium hinzugegeben und der gesamte Ansatz für 1 Stunde (37°C) unter Schütteln bei ca. 250 rpm inkubiert. Lediglich 200 µl der Suspension wurden auf LB-Agar Platten (mit Antibiotikum) ausplattiert, um einzelne Bakterienkolonien zu erhalten. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

2.1.7 Plasmidisolation aus Bakterien

Für die Plasmidisolation wurde zunächst ein einzelner Klon von der LB-Agarplatte isoliert und ü.N. bei 37°C in Kulturmedium (mit Antibiotikum) inkubiert. Je nach Menge der gewünschten DNA wurde eine Minipräparation oder Midipräparation durchgeführt. Für die Minipräparation wurden 2 ml LB- oder SOC Medium für die Kultur verwendet, bei einer Midipräparation 50 ml Medium.

Minipräparation: Die Übernachtskultur wurde in 2 ml Eppendorf Gefäß bei 13000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und lediglich das Bakterienpellet für die DNA-Gewinnung verwendet. Für die Isolation der Plasmid-DNA wurde das E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I nach Herstellerangaben verwendet: Die DNA wurde in 25 µl autoklaviertem ddH₂O eluiert.

Midipräparation: Für die DNA-Isolation wurde eine 50 ml Kultur in einem 50 ml Falcon für 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und lediglich das Pellet verwendet. Die Isolation erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit. Die DNA wurde anschließend in 50 µl autoklaviertem ddH₂O über die Säule eluiert.

2.1.8 Proteininduktion in BL21 (DE3)

Zur Proteininduktion wurde ein einzelner Klon isoliert und in 2 ml mit Ampicillin (LBA) versetztem LB-Medium ü.N. kultiviert. Am nächsten Tag wurden 500 µl der Übernachtskultur in 17 ml frisches LBA Medium überführt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. In 30 Minuten Abständen wurde die OD₆₀₀ der Kultur bestimmt. Bei Erreichen einer OD zwischen 0,4 und 0,6 wurde IPTG zur Proteininduktion zugeben (2 µl 0,5 M IPTG pro 1 ml Kultur). Die Inkubation und Proteinexpression erfolgte für 3 Stunden bei 37°C unter Schütteln. Anschließend wurde die Zellsuspension in Eppendorf Gefäße à 1 ml aliquotiert und bei 5000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Aufbewahrung bis zur Verwendung der Bakterienpellets erfolgte bei -20°C.

2.1.9 Klonierung des VAPA-Proteins aus einer humanen cDNA Bibliothek

Das humane VAPA musste zunächst aus einer cDNA Bibliothek amplifiziert werden. Verwendet wurde eine humane cDNA Bibliothek und nach folgendem Pipettierschema vorgegangen:

1	µl	cDNA Bibliothek
2	µl	Vorwärtsprimer (10 pM/µl)
2	µl	Rückwärtsprimer (10 pM/µl)
34,4	µl	H ₂ O
2	µl	MgCl ₂ (25 mM Stocklösung)
1	µl	dNTPs (10 mM Stocklösung, d.h. jeweils 200 µM)
1	µl	DMSO
5	µl	Pfu Puffer (10x)
0,5	µl	Pfu (2.5 U/µl)
0,2	µl	Taq (5 U/µl)
50	µl	Gesamtvolumen

Die PCR wurde im „MJ Mini Gradient Thermal Cycler“ (Bio-Rad) unter den folgenden Einstellungen durchgeführt:

35x	94°C	1:00min
	94°C	0:20min
	50°C-60°C	0:20
	72°C	1kb/2min (abhängig von der Größe des gewünschten DNA Abschnitts)
	72°C	7:00min
	4°C	unendlich

Die Aufreinigung des gewonnenen PCR Produktes erfolgte mit dem Cycle Pure Kit (Peqlab) nach Herstellerangaben. Die Elution erfolgte in 20 µl ddH₂O. Anschließend wurde eine Ligation in den pGEM-T-Easy Klonierungsvektor durchgeführt und das Ligationsprodukt in einem weiteren Schritt in E.Coli Bakterien transformiert (Kapitel 2.1.4).

5	µl	2x Ligationspuffer
1	µl	pGEM T-Easy Vektor
3	µl	PCR Amplifikation
<u>1</u>	<u>µl</u>	<u>T4 DNA Ligase</u>
10	µl	Gesamtvolumen

Für die Selektion der Klone wurde eine Blau-Selektion verwendet, da der pGEM-T-Easy Vektor (Promega) über einen β-Galactosidase Marker verfügt: Die LBA Platten wurden daher zusätzlich mit IPTG (20 µl; 0,5 M Stocklösung) und X-Gal (20 µl; 50 mg/ml Stocklösung) supplementiert. Lediglich weiße Klone haben das PCR Amplifikat aufgenommen, da durch die Insertation die codierende Region für die β-Galactosidase unterbrochen wird (Herstellerangaben, Promega). Diese Klone wurden als Übernachtskulturen in LB Medium, supplementiert mit dem benötigten Antibiotikum, für die DNA Isolation vorbereitet (Kapitel 2.1.7). Die Klone wurden anschließend sequenziert (Kapitel 2.1.23) und in den gewünschten Zielvektor subkloniert (siehe Kapitel 2.1.10).

2.1.10 Gerichtete Mutagenese der codierenden Sequenz des gewünschten Proteins

In dieser Arbeit wurden alle verwendeten Mutationen auf Aminosäureebene mittels einer positionsgerichteten Mutagenese in das jeweilige Plasmid eingefügt. Hierzu wurden DNA Primer (Invitrogen) entworfen, die die gewünschte Mutation enthalten, jedoch noch ausreichend Übereinstimmungen mit der Ausgangssequenz aufweisen, um sich an die DNA anlagern zu können. Die Mutagenese wurde mittels des Kits

„QuikChange II Site-Directed Mutagenesis“ (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach erfolgreicher Transformation in E.coli Bakterien und DNA-Aufreinigung wurde die codierende Sequenz des Proteins vollständig sequenziert. Für die Mutation positive Klone ohne weitere Zusatzmutationen wurden selektiert und in Übernachtskulturen für die DNA-Isolation (Kapitel 2.1.7) vermehrt. Anschließend wurde die codierende Basensequenz des Proteins mittels enzymatischem Verdau (vgl. Kapitel 2.1.11) subkloniert. Durch die Subklonierung in den Ausgangsvektor muss nicht das vollständige Plasmid auf unerwünschte Mutationen geprüft werden.

5	µl	codierende Sequenz des Proteins enzymatisch verdaut
2	µl	Vektor (enzymatischer Verdau mit denselben Enzymen, wie codierende Sequenz des Proteins)
2	µl	T4 Ligase Puffer (10x)
1	µl	T4 Ligase
10	µl	ddH ₂ O
20	µl	Gesamtvolumen bei 18°C ü.N. anschließend Transformation

2.1.11 Linearisierung und cRNA Herstellung

Als Basis für die *in vitro* Translation in cRNA wird linearisierte cDNA benötigt. Die Linearisierung erfolgte nach folgendem Ansatz:

X	µl	DNA-Plasmid (4 µg DNA)
1	µl	Enzym zur Linearisierung (NheI oder PmlI)
$\frac{Z}{10}$	µl	10x FastDigest Puffer
Y	µl	ddH ₂ O (auf Endvolumen Z auffüllen)
Z	µl	Endvolumen

Das verwendete Enzym ist abhängig vom Vektor des Konstrukts und den Restriktionsenzymen, die durch die codierende Basensequenz gegeben sind. Für Klonierungen, die sich im pSGEM befanden, wurde das NheI Enzym (FastDigest, Fermentas) verwendet. Wohingegen die verwendeten Konstrukte des pBF1-Vektors sich durch das Enzym PmlI (FastDigest, Fermentas) auszeichneten. Für die cRNA Synthese musste die linearisierte cDNA aufgereinigt werden. Dies erfolgte mittels des E.Z.N.A.® Cycle Pure Kits von Omega Biotek nach Herstellerangaben. Die DNA wurde für die weitere Verwendung in der cRNA Synthese in 15 µl ddH₂O aufgenommen. Diese erfolgte mit dem „mMESSAGE mMACHINE®-Kit“ (Ambion).

Je nach Vektor (siehe Anhang 6.4) wurde das Kit für einen SP6 oder T7 Promotor verwendet und folgender Ansatz gewählt:

7,5	µl	2x dNTP/CAP (Sp6 oder T7)
1,5	µl	10x Reaktions-Puffer
4,5	µl	Linearisierte Plasmid-DNA
1,5	µl	<u>Enzym-Mix</u>
15	µl	Gesamtvolumen

Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 37°C und anschließend wurde 1 µl Turbo DNase zugeben, um die eingesetzte DNA Menge zu verdauen. Der Verdau fand für 15 Minuten bei 37°C statt. Die Fällung der cRNA wurde mittels der Zugabe von 30 µl Lithiumchlorid (7,5 M Lithiumchlorid, 50 mM EDTA) und 25 µl ddH₂O ü.N. bei -20°C durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Zentrifugation (30 Minuten bei 13000 rpm, 4°C). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und lediglich das entstandene cRNA Pellet weiter verwendet. Dieses wurde durch die Zugabe von 150 µl Ethanol (80%) während einer Zentrifugation (20 Minuten bei 13000 rpm, 4°C) gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das cRNA Pellet bei 37°C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde anschließend in 12 µl ddH₂O gelöst, die Konzentration bestimmt (Kapitel 2.1.13) und die Qualität überprüft (Kapitel 2.1.12).

2.1.12 Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Qualität der cRNA, als auch für die Klonierung wurden 1,5% Agarose-Gele verwendet. Zur Herstellung wurden 2 g PeqGold Agarose (Peqlab) in 140 ml TAE (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure 1 mM EDTA)-Puffer gelöst. Das Gemisch wurde mittels Mikrowelle aufgekocht und anschließend nach Abkühlung auf Handwärme 4 Tropfen Ethidiumbromid Stammlösung (Roth, 250 µg/ml) eingetropft. Nach dem Durchmischen wurde die flüssige Agarose in die Gelkammern gegossen. Die Gele wurden bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt. Für die Gelelektrophorese wurde das Gel in eine mit 1x TAE gefüllte Laufkammer gelegt. Je nach Fragmentgröße der DNA wurde der „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ (250-10000 bp) oder der „GeneRuler Express DNA Ladder“ (100-5000 bp) der Firma Thermo Fisher verwendet. Die aufzutragenden Proben wurden mit dem „6x DNA Loading Dye“ (Fermentas) vorbereitet. Die Auftrennung erfolgte je nach Anwendung in 8-20 Minuten bei einer Spannung von 110 mV. Für die Dokumentation wurden die Gele auf ein UV-Gerät (BXT-20.M, UVItec) aufgelegt, fotografiert und ausgedruckt.

2.1.13 Konzentrationsbestimmung der DNA und cRNA

Die Konzentration der cRNA wurde mittels eines Photospektrometers (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific) bestimmt. Hierzu wurde zunächst ein Referenzwert (ddH₂O) bestimmt und anschließend die cRNA oder DNA gemessen. Hierzu wurde jeweils 1 µl der Probe auf den Probenteller pipettiert. Das Prinzip beruht auf der Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$, 280 nm und 230 nm . Das Verhältnis der Messwerte zueinander gibt Auskunft über die Reinheit der DNA oder cRNA. Das Verhältnis 260/280 nm sollte für DNA bei $\sim 1,8$ liegen, für cRNA bei $\sim 2,0$. Das Verhältnis 260/230 nm sollte für reine DNA und cRNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Verdünnungen der cRNA wurden ebenfalls mittels des NanoDrop 2000c kontrolliert.

2.1.14 Herstellung Proteinlysate

In dieser Doktorarbeit wurden Lysate zur genaueren Analyse aus den verschiedenen Zelllinien gewonnen. Die Extraktion ist jedoch von der Zelllinie unabhängig und wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Die Zellen wurden zunächst auf Eis gestellt, um eine Proteindegradation zu vermeiden. Um Verunreinigungen mit Albumin aus dem Zellkulturmedium zu vermeiden, wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit 1x PBS (eiskalt) gewaschen. Vor dem Ablösen der Zellen wurde das PBS entfernt und 1 ml frisches PBS pro Schälchen (35 mm Nunc) hinzugefügt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen gelöst und anschließend in ein Eppendorf Gefäß überführt. Zu der Zellsuspension wurden 0,5 ml PBS hinzugefügt und es erfolgte eine Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 Minuten. Die gewünschten Proteine befinden sich lediglich im Pellet, sodass der Überstand entfernt wurde und anschließend das Pellet in 100 µl RIPA Puffer (supplementiert mit 2 µl PIC-Protease Inhibitor Cocktail, Sigma) resuspendiert wurde. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten unter Schütteln auf Eis. Eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 13000 rpm trennte die Zellfragmente vom Überstand, welcher das gewünschte Protein enthielt. Die Proteinlysate wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C gelagert.

2.1.15 Bradford-Assay

Um die Menge an Protein in den Proteinlysaten (Kapitel 2.1.14) zu bestimmen, wurde ein so genannter Bradfordassay durchgeführt. Hierzu wurde mittels kommerziell erhältlichen Proteinstandards (Pierce, Stocklösung 2 mg/ml), die eine definierte Menge an Protein in µg enthalten, eine Standardkurve erzeugt. Es wurden die Standards (4 µl) mit 200 µl Bradford-Lösung (Thermo Fisher Scientific) vermischt und nach 10 Minuten

Inkubation mittels NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Die Messwerte ergeben anschließend die Standardkurve, die für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen verwendet wird. Die Auswertung erfolgt mittels der mitgelieferten NanoDrop Software. Für die eigentlichen Proben wurden 1 µl Lysat und 3 µl H₂O mit 200 µl Bradford-Assay Lösung gemischt und ebenfalls für 10 Minuten inkubiert. Die Proben wurden mit dem Nanodrop 2000c gemessen (Doppelbestimmung, d.h. für jedes Proteinlysate wurden zwei Ansätze gemacht, die jeweils zweimal gemessen wurden – vier Messungen insgesamt), die Werte wurden gemittelt und somit die Konzentration in µg/ml bestimmt. Die verschiedenen Lysate wurden anschließend durch Zugabe von RIPA Puffer auf die gleiche Konzentration verdünnt.

2.1.16 *In vitro* Translation

Um ein Protein zellfrei zu translatieren wurde das „TnT® Quick Coupled Transcription/Translation System“ (Promega) verwendet. Es wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen und der Ansatz für 90 Minuten bei 30°C inkubiert.

40	µl	TNT T7 Quick Mastermix
1	µl	Methionin
1	µg	Plasmid-DNA (mit T7 Promotor)
		mit ddH ₂ O ergänzen
50	µl	Gesamtansatz

2.1.17 SDS-PAGE und Western Blot

Zum spezifischen Nachweis von bestimmten Proteinen in Lysaten wurde eine SDS-PAGE Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wurden je nach Versuchsaufbau 8%, 10% oder 14% SDS-Gele gegossen. Die Zusammensetzung des jeweiligen Gels und dessen Verwendung können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Trenngel 8%	2,15 ml Tris-HCl (1M, pH 8,8); 1,87 ml ddH ₂ O; 1,45 ml Acrylamid; 28 µl SDS-Lösung (20%); 15µl APS (30%); 6 µl TEMED	Für Proteine größer als 100 kDa
Trenngel 10%	2,15 ml Tris-HCl (1M, pH 8,8); 3,00 ml ddH ₂ O; 1,8 ml Acrylamid; 28 µl SDS-Lösung (20%); 15µl APS (30%); 6 µl TEMED	Für Proteine zwischen 50 und 100 kDa
Trenngel 14%	1,38 ml Tris-HCl (1M, pH 8,8); 1,45 ml ddH ₂ O; 1,8 ml Acrylamid; 28 µl SDS-Lösung (20%); 15µl APS (30%); 6 µl TEMED	Für Proteine kleiner als 50 kDa
Sammelgel 5%	200 µl Tris-HCl (1M, pH 6,8); 2,5 ml ddH ₂ O; 488 µl Acrylamid; 16 µl SDS-Lösung (20%); 5 µl APS (30%); 5 µl TEMED	Für alle Proteine

Die gegossenen Gele wurden im Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Biorad) für die Gelelektrophorese eingesetzt. Die Proben (10 µl) wurden zuvor mit 10 µl 2xSDS Ladepuffer (125 mM TrisHCl pH 6.8, 20% Glyzerin, 4% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 100 mM DTT) vermischt und anschließend für 10 Minuten bei 40°C gekocht. Vor dem Auftragen der Proben (18 µl) erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 rpm für 3 Minuten. Als Marker wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 – 170 kDa)“ (Fermentas) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei konstanten 35 mA bis zum gewünschten Auftrennen der Banden durchgeführt.

Anschließend wurden die Proteine mittels „Semi-dry“ (Biorad) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dies erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 70 mA für 45 Minuten bis 1,5 Stunden. Anschließend wurde die Membran per Ponceau-Färbung angefärbt, um den Transfer zu prüfen. Bei Bedarf wurden Aufnahmen (Scan) zur späteren Darstellung der Ladekontrolle gemacht. Die Blots wurden je nach verwendetem Antikörper in 5% Milchpulver/ 1x TBS mit 0,1% Tween (TBST) oder 5% BSA/TBST für 1 Stunde geblockt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte ü.N. bei 4°C und leichtem Schütteln bei 50 rpm. Die eingesetzten Erstantikörper können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration	Verwendung
anti HCN2	Alomone	1:200	in 5% BSA/TBST
anti GFP	abcam	1:5000	in 5% Milchpulver/TBST

Am nachfolgenden Tag wurde der Blot dreimal à 15 Minuten in TBST gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde bei RT unter Schütteln (50 rpm) inkubiert. Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich um einen „Horseradish Peroxidase“ (HRP) markiertes Immunglobulin. Bei der Exposition mit einem geeigneten Substrat (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific) reagiert diese mit der Bildung einer Chemilumineszenz. Der im Western Blot verwendete Zweitantikörper ist in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration	Verwendung
anti rabbit HRP	Pierce	1:2000	in 5% BSA/TBST oder 5% Milchpulver/TBST

Zum Waschen des Blots wurde erneut TBST verwendet und ebenfalls dreimal à 15 Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion mittels des Geräts „Fusion-SL“ (Peglab) auf Chemilumineszenzbasis. Hierzu wurden die Blots für 5 Minuten mit dem Chemilumineszenzsubstrat inkubiert.

2.1.18 Aufreinigung induzierter GST-Proteine

Nach der Proteininduktion in BL21 (DE3) Bakterien (Kapitel 2.1.8) sollte das Protein aus den Bakterien extrahiert werden. Hierzu wurde ein Lysozymverdau durchgeführt. 0,1 g Lysozym wurden in 1 ml RIPA Puffer gelöst. Pro Pellet wurden 200 µl RIPA Puffer mit 40 µl Lysozym-RIPA Puffer zugeben und gevortext. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten auf einer Drehscheibe bei Raumtemperatur inkubiert. Der darauf folgende Vorgang des „6x Freeze&Thaw“, darunter wird das wiederholte Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff und dem anschließenden Auftauen bzw. Erhitzen bei 37°C verstanden, schließt diesen Prozess ab. Zur Aufreinigung wurden die Proben für 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Der Überstand enthielt das gewünschte Protein.

2.1.19 „GST-Pulldown“

Um eine Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen, kann ein „GST-Pulldown“ verwendet werden. Für die „Pulldowns“ wurde das „MagneGST™ Pull-Down System“ (Promega) verwendet. Für den „GST-Pulldown“ wurden die gewünschten Konstrukte in pGEX Vektoren kloniert. Diese haben die Eigenschaft, dass nach erfolgter Transformation in Bakterien eine Proteininduktion durch die Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) erreicht werden kann. IPTG ist ein künstlicher

Induktor des Lactose-Operons, welches im Falle des pGEX Vektors die Translation des gewünschten GST-Proteins kontrolliert. Anschließend kann aus den Bakterien dieses induzierte Protein aufgereinigt und an sogenannte „Beads“ gebunden werden. Die „Beads“ sind in diesem Versuchsaufbau kleine magnetische Partikel, die das GST-Protein kovalent binden. Die Funktionsweise des GST-„Pulldowns“ basiert auf der Verwendung des GST-Fusionsproteins als Köder für das Zielprotein. Die GST-Proteine binden wiederum kovalent an die magnetischen „Beads“, welche somit als Angel fungieren. Anschließend sollte bei einer Interaktion ein Komplex aus GST-Fusionsprotein, dem Interaktionspartner und den „Beads“ entstehen, der aufgrund der magnetischen Eigenschaften der Beads leicht durch Waschschriffe aufgereinigt werden kann. Handelt es sich bei der Interaktion um eine starke Bindung zwischen dem GST-Fusionsprotein und dem Zielprotein, ist dieses auch nach den Waschschriffen noch gebunden. Proteine, die unspezifisch an das GST-Protein binden, werden durch die stringenten Waschschriffe entfernt. Um die Proteine von den „Beads“ zu lösen wird SDS (Natriumdodecylsulfat- **S**odium **D**odecyl **S**ulfat) Ladepuffer zugegeben. Hierdurch werden sowohl die Bindung des GST-Fusionsproteins zu den „Beads“, als auch die Interaktion zwischen den gebundenen Proteinen wieder gelöst (Abbildung 2.1).

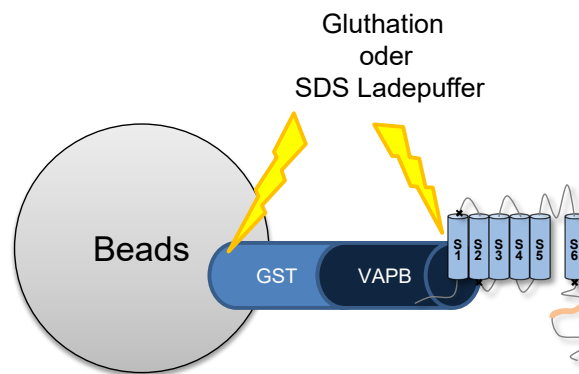


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des GST-Komplexes

Darstellung des gebundenen Zielproteins an das GST-Fusionsprotein (GST-VAPB), welches wiederum kovalent an die magnetischen Beads gebunden ist. Diese Bindungen können durch die Zugabe von SDS Ladepuffer oder Glutathion (lediglich lösen der Bindung zwischen den „Beads“ und dem Fusionsprotein) gelöst und die aufgereinigten Proteine mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese (**S**odium **D**odecyl **S**ulfate **P**olyacrylamide **G**el **E**lectrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt und analysiert werden.

Für die „GST-Pulldown“-Experimente wurden verschiedene Versuchsansätze gewählt. Der Nachweis der Interaktion aus einem Zelllysat ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt.

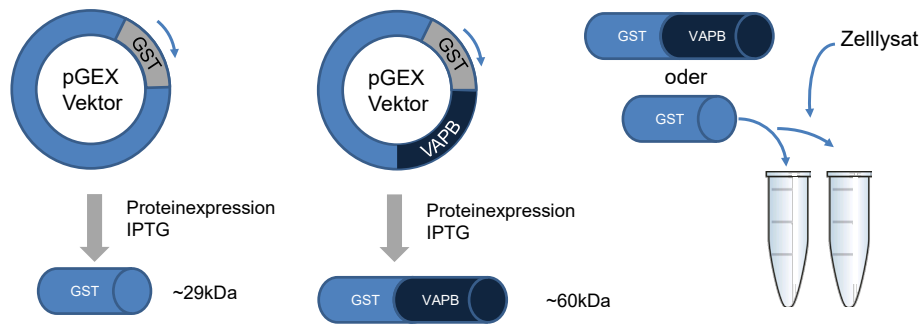


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der „GST-Pulldown“-Experimente bei der Verwendung eines Zelllysats

Das GST-Protein und das GST-VAPB Fusionsprotein entstehen durch eine Induktion der Proteintranslation mittels IPTG Zugabe in bakteriellen Zellen (BL21). Diese werden dann nach Gewinnung aus den Bakterien in den „GST-Pulldown“ Ansatz eingesetzt. Zunächst werden die GST-Fusionsproteine an die magnetischen „Beads“ gebunden und so aufgereinigt. Anschließend können die an die „Beads“ gebundenen GST-Fusionsproteine im „Pulldown“ eingesetzt werden und das gewünschte Zelllysate zugegeben werden. Für die Kontrollexperimente wird lediglich das GST-Protein verwendet, für die Interaktionsnachweise das GST-VAPB-Protein. Statt dem GST-VAPB-Protein konnten in den „Pulldown“-Experimenten auch weitere GST-Fusionsproteine verwendet werden, um eine Interaktion des HCN2-Kanals mit weiteren zu untersuchenden Proteinen nachzuweisen.

Zunächst wurden die magnetischen GST-Partikel vorbereitet. 20 µl Partikel wurden dreimal mit 250 µl PBS gewaschen, sodass sie für die Bindung des GST-Proteins bereit sind. Die zuvor aufgereinigten GST-Proteinlysate (Kapitel 2.1.18) wurden mit 100 µl Bindepuffer aus dem Kit und den vorbereiteten magnetischen Partikeln für 30 Minuten auf einer Drehscheibe bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und erneut mit 250 µl PBS dreimal gewaschen. Aufgenommen wurden die Beads danach in 20 µl Bindepuffer. Die Partikel (Beads) sind nun bereit, mit dem gewünschten Proteinlysate (Kapitel 2.1.14) oder der *in vitro* Translation (Kapitel 2.1.16) inkubiert werden. Hierzu wurden 10 µl Beads, 20 µl 10% BSA/Bindepuffer, 150 µl Bindepuffer und 20 µl Proteinlysate gemischt und für 1 Stunde bei RT auf einer Drehscheibe stetig bewegt. Zur Aufreinigung wurden die Beads dreimal mit jeweils 400 µl Waschpuffer à 5 Minuten gewaschen. Die Elution erfolgte durch Resuspendieren in 10 µl 2x SDS Ladepuffer und 10 µl 1x PBS für 5 Minuten. Anschließend wurden die Beads entfernt und lediglich der Überstand für den späteren Western Blot aufbewahrt.

2.1.20 Oberflächenexpressionsanalyse in Oozyten

Für die Oberflächenexpressionsanalyse wurden Konstrukte mit extrazellulärem HA-Epitop in Oozyten injiziert sowie nicht injizierte Oozyten als Kontrollen verwendet. 48 Stunden nach Injektion wurde der Assay durchgeführt. Hierzu wurden die Oozyten zunächst in 200 µl 1%BSA/ND96 für 30 Minuten geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (α -HA 1:100 in 1%BSA/ND96) für 1 Stunde auf

Eis und darauffolgend sechs Waschschr tte in 1%BSA/ND96   5 Minuten. Als Zweitantikörper wurde ein Peroxidase gekoppelter α -Ratte Antikörper verwendet, der für 1 Stunde auf Eis inkubiert wurde. Gefolgt wurde dies von 12 Waschschr tten in 1%BSA/ND96   5 Minuten und sechs Waschschr tten   15 Minuten in 1x ND96. Die Messung der Oozyten erfolgte einzeln jeweils in einem Eppendorf Gefäß mit 20 μ l Chemilumineszenzsubstrat (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific) im Luminometer (GloMax[®] 20/20, Promega). Die Maxima der Lumineszenz wurden gemittelt.

2.1.21 Analyse der Oberflächenexpression in HeLa-Zellen

Hierzu wurden transfizierte HeLa-Zellen in 35 mm Nunc Schälchen mit 1x PBS gewaschen und mit 4% PFA für 20 Minuten auf Eis fixiert. Die anschließenden drei Waschschr tte   5 Minuten mit 1x PBS entfernten das verbliebene PFA. Die Zellen wurden mit 10% Normal Goat Serum (Ziegenserum) in 1x PBS mit 0.1% Natriumazid (Invitrogen) für 1 Stunde bei RT geblockt und anschließend mit α -HA (1:100 in PBS, Santa Cruz) für 1 Stunde inkubiert. Durch viermal Waschen   10 Minuten wurde der ungebundene Erstantikörper entfernt, gefolgt von einer Inkubation mit dem α -Ziege Zweitantikörper (1:5000, Santa Cruz) für ebenfalls 1 Stunde. Vor der Messung im Luminometer (GloMax[®] 20/20, Promega) unter Verwendung des Chemilumineszenzsubstrats (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific) wurden die Schälchen viermal   15 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Auch hier wurde das Maximum der Lumineszenz gemittelt.

2.1.22 Antikörperfärbung von kortikalen Neuronen

Für die Antikörperfärbungen mussten die kortikalen Neurone zunächst mit 4% PFA/PBS fixiert werden. Es folgte eine Inkubation für 15 Minuten mit anschließendem zweimaligem Waschen mit 1x PBS. Um den Antikörpern den Zugang zum Zellinneren zu gewährleisten, wurden die Zellen zusätzlich mit 0,25% Triton-X in PBS für 5 Minuten behandelt. Anschließend wurden die Neurone zweifach in 1x PBS für 5 Minuten gewaschen. Um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, wurden die Proben mit 10% Ziegenserum/PBS bei Raumtemperatur geblockt und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend konnten die gewünschten Primärantikörper verwendet werden, die bei 4 C  .N. inkubierten:

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration	Verwendung
anti-HCN2	Alomone	1:200	in 3% Ziegenerum/PBS
anti-MAP2	Millipore/ Chemicon	1:80	in 3% Ziegenerum/PBS
anti-HA (Roche)	Roche	1:100	in 3% Ziegenerum/PBS

Am nächsten Tag wurden die Proben dreimal à 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Und sofort mit dem Zweitantikörper für 1 Stunde bei Dunkelheit inkubiert. Die verwendeten Zweitantikörper können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden:

Bezeichnung	Hersteller	Konzentration	Verwendung
Alexa Fluor 488 anti rabbit (grün)	Molecular Probes	1:2000	in 3% Ziegenerum/PBS
Alexa Fluor 568 anti rat (rot)	Molecular Probes	1:2000	in 3% Ziegenerum/PBS
DyLight™649 Goat anti-mouse (blau)	Thermo Scientific	1:2000	in 3% Ziegenerum/PBS

Das nachfolgende dreifache Waschen à 5 Minuten bereitet die Proben auf das Eindeckeln in Mowiol (Herstellung nach Herstellerangaben, Carl Roth) vor. Mowiol dient der Konservierung der Dauerpräparate.

2.1.23 Sequenzierungen

Die Sequenzierung der Plasmid DNA erfolgte durch die Firma Seqlab. Die Proben wurden hierzu auf 100 ng/µl verdünnt und unter Zugabe des gewünschten Primers eingesendet. Die erhaltenen Sequenzierungen wurden anschließend mit der Hilfe von dem Programm Sequencer (Gene Codes), Chromas (Technelysium) oder der Onlinesite der Harvard Medical School (Vereinigte Staaten) „Web Map Preferences“ (http://pga.mgh.harvard.edu/web_apps/web_map/start) auf erfolgreiche Mutagenese, Subklonierung oder korrekten Leserahmen gesichtet

2.1.24 Verwendete Plasmide

Die vollständige Liste der verwendeten Plasmide kann dem Anhang entnommen werden. Es wurden Vektoren beziehungsweise Plasmide in Abhängigkeit vom experimentellen Aufbau verwendet.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien

In dieser Doktorarbeit wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet. Hierbei handelt es sich um HeLa-Zellen, CHO-Zellen und HL-1 Zellen. Bei HeLa-Zellen handelt es sich um Epithelzellen, die aus einem Cervixkarzinom gewonnen wurden, benannt nach Henrietta Lacks (Patientin). CHO-Zellen stammen aus Ovarien des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*). Bei HeLa- als auch CHO-Zellen handelt es sich um immortalisierte Zelllinien. Bei der HL-1 Zelllinie handelt es sich zusätzlich um eine spontan aktive Zelllinie, die aus Herzmuskelzellen besteht, die in der Lage sind sich selbst zu kontrahieren.

2.2.2 Zellkulturbedingungen der verwendeten Zelllinien

Für die HeLa-Zellen wurde DMEM (Invitrogen) supplementiert mit 10% FBS (Gibco) und 1% Penicillin Streptomycin (Antibiotikum, Gibco), für die CHO-Zellen wurde Ham F12 (Invitrogen) mit 10% FBS (Gibco) verwendet. Die HL-1 Zellen benötigten Claycomb Medium mit 10% FBS (Sigma), 100 µg/ml Streptomycin (Sigma), 0,1 mM Noradrenalin (Sigma), 2 mM Glutamin (Sigma). Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% Atmosphäre CO₂ kultiviert. Die HeLa- und CHO-Zellen wurden in T25 Flaschen mit 5 ml Vollmedium, die HL-1 Zellen mit 15 ml Medium in T75 Flaschen kultiviert. Alle supplementierten Medien wurden im Nachfolgenden als Vollmedium bezeichnet.

2.2.3 Passagieren der CHO- und HeLa-Zellen

Die Zellen wurden in T25 Flaschen (Sarstedt) mit Filter kultiviert. Zur Passage der HeLa-, als auch CHO-Zellen, wurde der Zellrasen zunächst mit PBS (37°C) gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA (Invitrogen) überschichtet und bis zum Ablösen der Zellen im Inkubator bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen an den Flaschenrand wurden die restlichen Zellen gelöst. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 9 ml des entsprechenden Vollmediums zugegeben und die Suspension in einen Falcon überführt. Eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 2 Minuten pelletierte die Zellen und ermöglichte ein Entfernen des Überstands. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Vollmedium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen (T25), Zellkulturschälchen (Nunc 35mm) oder Glasbodenschälchen für das Imaging (WillCo) verteilt.

2.2.4 Zellkulturrpflge der HL-1 Zellen

Die HL-1 Zellen wurden nach dem vorgegebenen Protokoll von W.C. Claycomb gepflegt. Zunächst wurden die Flaschen (T75, Sarstedt) mit 0,02% Gelatine (Rind, Sigma), welche mit Fibronectin (1 mg in 200 ml, Sigma) supplementiert wurde, für 2 Stunden im Inkubator (5% CO₂, 37°C) beschichtet. Für das Passagieren und Aussähen der Zellen wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: Nach dem Waschen der Zellen mit 1x PBS (Sigma) erfolgte die Zugabe von 5 ml Trypsin (Sigma), welches für 5 Minuten bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wird das zugegebene Trypsin durch frisches ersetzt und drei weitere Minuten im Inkubator bei 37°C inkubiert, bis die Zellen beginnen sich zu lösen. Durch leichtes Klopfen an den Flaschenboden wird der Vorgang des Ablösens beschleunigt. Waren alle Zellen abgelöst, wurde mit 7 ml Waschpuffer (Claycomb Medium + 5% FBS) nachgespült und die gesamte Suspension in einen 14 ml Falcon überführt. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in 9 ml Claycomb Vollmedium. Für die Aufrechterhaltung der Zellkultur wurden 3 ml der Zellsuspension in eine neue T75 überführt. Für die Messungen wurden 200 µl oder 400 µl Zellen in beschichtete 35 mm Nunc Schälchen ausgesät.

2.2.5 Puromycin Behandlung der HL-1 Zellen

Zur Selektion der transfizierten HL-1 Zellen wurde eine Behandlung mit Puromycin durchgeführt. Hierzu wurde 24 Stunden nach Transfektion das Medium durch Claycomb Vollmedium mit 5 µg/ml Puromycin ersetzt. Die Inkubation erfolgte für 72 Stunden bei täglichem Wechsel des Mediums.

2.2.6 Transfektion der Zellkulturzellen

Für die Transfektion der HeLa-, CHO- und HL-1 Zellen wurde das Transfektionsreagenz jetPRIME (Peglab) verwendet. Die Schälchen wurden mit einer DNA Menge zwischen 1 µg und 2 µg Plasmid DNA transfiziert. Für die Transfektion eines Schälchens wurden 200 µl jetPRIME Puffer mit der gewünschten DNA Menge in einem Eppendorf Gefäß durch Vortexen gemischt. Anschließend wurden 4 µl jetPRIME Transfektionsreagenz hinzugefügt und für 10 Sekunden gevortext und mit einer Tischzentrifuge bei geringer Geschwindigkeit zentrifugiert. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Ausbildung der Transfektionskomplexe (DNA und Transfektionsreagenz) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung auf die im Vollmedium kultivierten Zellen getropft.

2.3 Elektrophysiologische Untersuchungen

2.3.1 Lösungen der TEVC Messungen

Zusammenfassung der verwendeten Lösungen:

1x ND96 (Messlösung TEVC):

NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM
Der pH-Wert wurde mittels NaOH auf pH 7,5 (Raumtemperatur) eingestellt und die Lösung bei Zimmertemperatur gelagert sowie verwendet.

1x ND66 (Messlösung TEVC):

NaCl 66 mM, KCl 32 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM
Der pH-Wert wurde mittels NaOH auf pH 7,5 (Raumtemperatur) eingestellt und die Lösung bei Zimmertemperatur gelagert sowie verwendet. Diese Lösung wurde für die Messungen des VAPA/B Komplexes, sowie die Messungen der C-terminalen Trunkationen des HCN2-Kanals verwendet.

Aufbewahrungslösung:

Als Aufbewahrungslösung wurde eine 1x ND96 mit 88 mg Theophillin, 274 mg Magnesiumpyruvat und 50 mg Gentamycin supplementiert. Anschließend wurde der pH-Wert auf einen pH 7,5 bei Raumtemperatur mit NaOH eingestellt. Die Lagerung der Lösung erfolgte bei 4°C.

Pipettenlösung der Oozytenmessungen:

Zum Befüllen der Glaselektroden wurde eine 3 M KCl-Lösung verwendet. Die Elektroden hatten somit einen Widerstand zwischen 0,2 und 1,4 Ω .

Blockerlösungen:

Für die Experimente mit ZD7288 wurde diese in DMSO gelöst und anschließend in der Messlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.3.2 Messlösungen der Patch-Clamp Experimente mit HL-1 Zellen

Für die Messung der Stromamplituden der HL-1 Zellen wurden folgende Lösungen verwendet:

Badlösung:

Die Badlösung enthielt die nachfolgenden Inhaltsstoffe: NaCl 140 mM, KCl 25 mM, CaCl₂ 1,8 mM, 1,2 mM MgCl₂, Glucose 10 mM, HEPES 5 mM, NiCl₂ 2 mM, BaCl₂ 2 nM, 4-Aminopyridin 0,5 mM.

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf den pH 7,5 bei Raumtemperatur eingestellt. Die Inhaltsstoffe BaCl₂, NiCl₂ und 4-Aminopyridin dienten als Blocker, um unerwünschte Ströme zu eliminieren, die aufgrund der Expression der entsprechenden Ionenkanäle in HL-1 Zellen vorhanden sind. Es sollten Kalzium-Ströme (T- und L-Typ) sowie Kaliumströme unterbunden werden, um eine bessere Messqualität der I_f -Ströme zu gewährleisten. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.

Pipettenlösung:

Die Pipettenlösung enthielt folgende Inhaltsstoffe: Kaliumaspartat 120 mM, TEACl 10 mM, Na₂GTP 0,1 mM, Na₂ATP 5 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA (Säureform) 11 mM, CaCl₂ 5 mM, HEPES 10 mM. Der pH-Wert wurde mit KOH auf den pH 7,2 bei Raumtemperatur eingestellt. Die Pipettenlösung wurde bei -20°C gelagert und vor der Verwendung auf Eis aufgetaut sowie gefiltert. Sie enthielt TEA um die spannungsabhängigen Kaliumkanäle zu blockieren.

Neben den Stromamplitudenmessungen der I_f -Ströme wurden auch Aktionspotentialmessungen durchgeführt. Für die Aktionspotentialmessungen der HL-1 Zellen wurden folgende Lösungen verwendet:

Badlösung:

NaCl 135 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, NaH₂PO₄ 0,33 mM, HEPES 10 mM, Glucose 10 mM, CaCl₂ 1 mM, Natriumpyruvat 2 mM. Der pH-Wert von 7,4 wurde mit NaOH bei Raumtemperatur eingestellt. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert und vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt.

Pipettenlösung:

NaCl 120 mM, K-Glutamat 10 mM, EGTA 5 mM, Na₂GTP 0,2 mM, K₂ATP 3 mM, MgCl₂ 3,5 mM, CaCl₂ 2 mM, HEPES 5 mM. Der pH-Wert von 7,2 wurde mit NaOH bei Raumtemperatur eingestellt. Die Pipettenlösung wurde bei -20°C gelagert und vor Verwendung auf Eis aufgetaut und gefiltert.

2.3.3 cRNA Injektion

Für die Injektion wurde die cRNA zunächst per *in vitro* Transkription synthetisiert (Kapitel 2.1.11) und anschließend mittels dem „Nanoject II™ Auto-Nanoliter Injector“ (Drummond Scientific Company) die cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Zur Injektion wurden Glaskapillaren verwendet („3,5" Drummond Replacement Tubes“, Drummond Scientific Company). Diese Kapillaren wurden mit Hilfe des DMZ-Universal

Pullers (Zeitz) ausgezogen und anschließend mit der „Microforge“ (Narishige) in die gewünschte Form gebracht. Die Injektion erfolgte knapp unterhalb der Oberfläche und es wurde pro Oozyte ein Volumen von 50,6 nl injiziert.

2.3.4 Messungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC)

Die Oozyten wurden bis zu ihrer Messung in einer Aufbewahrungslösung bei 18°C inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur gemessen. Zur Messung wurden Glaselektroden verwendet, die mit einer 3 molaren KCl gefüllt wurden und einen Widerstand zwischen 0,4- 1,2 MΩ aufwiesen. Die Messungen wurden mit einem „Axoclamp 900A“ Verstärker (Axon Instruments) und dem Analog/Digital-Wandler „Digidata 1440A“ (Axon Instruments) durchgeführt, der die Daten an den Computer vermittelte. Folgende Programme wurden verwendet: Steuersoftware für den Verstärker (Axoclamp, Molecular Devices), die Software zur Erfassung der Daten (Clampex, Molecular Devices) und für die Auswertung (ClampFit, Molecular Devices).

2.3.5 Aktionspotentialmessungen und Strommessungen an HL-1 Zellen mittels der Patch Clamp Methode

Für die Aktionspotentialmessungen und Strommessungen der HL-1 Zellen wurden die im Kapitel 2.3.2 angegebenen Lösungen verwendet. Die Glaskapillaren wurden mit dem „DMZ Universal Puller“ (Zeitz) ausgezogen und hatten nach der Füllung mit Intrazellulärlösung (Kapitel 2.3.2) einen Widerstand von 2- 3,5 MΩ. Für die Messungen der Stromamplitude wurde die „Whole-Cell“-Konfiguration unter dem „Voltage Clamp“-Modus gewählt. Im „Voltage Clamp“ wird eine feste Spannung vorgegeben, sodass die gesamte Zelle auf diese bestimmte Spannung geklemmt wurde und eine Ionenkanalantwort erreicht wurde. HL-1 Zellen exprimieren neben den HCN-Kanälen noch weitere Ionenkanäle, daher wurden der Badlösung Nickelchlorid, Bariumchlorid und 4-Aminopyridin als Blocker hinzugefügt. Die Zusammensetzung kann dem Kapitel 2.3.2 entnommen werden. Für die Aktionspotentialmessungen wurde ebenfalls in der „Whole-Cell“-Konfiguration gemessen, jedoch im „Current Clamp“-Modus bei dem indirekt ein Strom appliziert werden kann. Da es sich bei den HL-1 Zellen jedoch um spontan aktive Zellen handelt, wurde kein Strom appliziert, sondern lediglich aufgezeichnet. Es wurden ausschließlich gleichmäßig grün leuchtende Zellen gepatcht. Für die Messungen der Stromamplituden sowie Aktionspotentialmessungen wurde neben VAPB pcDNA3.1 auch eGFP ko-transfiziert. eGFP wird durch UV-Licht angeregt und emittiert grünes Licht bei ~508 nm. Bei der Transfektion mit shRNA war keine Ko-Transfektion notwendig, da dieses Plasmid bereits über ein integriertes GFP

verfügte. Die Daten wurden mit dem „EPC 10“ (Heka) generiert und mit der „Patchmaster“ (Heka) Software aufgezeichnet. Für die Auswertung der Daten wurde die „Fitmaster“ (Heka) Software verwendet.

2.3.6 EKG Messungen

Die Maus EKG Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Larissa Fabritz (Universität Birmingham) durchgeführt. Für die Messungen wurden Tiere unterschiedlicher Altersgruppen verwendet, um einen altersabhängigen Effekt auszuschließen. Die älteren Tiere hatten hierbei ein Durchschnittsalter von 82,5 Wochen, während die jungen Mäuse ein Alter von 21 Wochen aufwiesen. Zusätzlich wurden die Tiere im wachen Zustand, als auch im sedierten Zustand (Isofluran 1,5 Vol %) untersucht. Bei den EKG Messungen handelte es sich um ein nicht-invasives 6-Kanal EKG. Die Tiere wurden hierzu in einem EKG Tunnelsystem („ecgTUNNEL“, EMKA Technologies) fixiert und in ihrer Bewegung eingeschränkt. Die zweiminütigen EKG Messungen wurden mit vier Kontaktelektroden an den Füßen gemessen.

2.4 Statistik

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm Excel (Microsoft). Mittelwerte, Fehler der Standardabweichung (SEM) und Signifikanzlevel (T-Test) wurden mit Hilfe des Programms bestimmt. Bei der Ermittlung des P-Wertes (T-Test) wurde auf eine zweiseitige Verteilung (ungepaart) geachtet und der Wert homoskedastisch ausgewertet. Mittels des ausgegeben P-Wertes kann angegeben werden, ob sich zwei Datenpopulationen signifikant statistisch unterscheiden oder nicht. Je kleiner der P-Wert, desto höher ist die Signifikanz des Unterschieds. Die Signifikanz in den Abbildungen wurde mit Hilfe von Asterisk-Symbolen dargestellt. Ein P-Wert kleiner als 0,05 wurde mit einem `*` markiert, während P-Werte zwischen 0,01 und 0,001 mit `**` bezeichnet wurden. Als höchste Signifikanz wurde `***` verwendet, es schließt P-Werte ein, die kleiner als 0,001 sind. Für die Darstellung der Daten in Graphen wurde das Programm OriginPro 8 (OriginLab Cooperation) verwendet. Für das Erstellen von Kurvenanpassungen (Fits) wurden die in diesem Programm verfügbaren mathematischen Funktionen genutzt. Für die Auswertung der $V_{1/2}$ Werte wurde die Boltzmann-Funktion mit der folgenden Formel verwendet:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2$$

Die Auswertung der Zeitkonstanten τ erfolgte mit der Clampfit (Axoclamp) oder Fitmaster (Heka) Software mit Hilfe eines monoexponentiellen Fits.

2.5 Fluoreszenzmikroskopie

2.5.1 Imaging der Zellkulturzellen

Die transfizierten Zellen wurden mit Hilfe des „Axio Observer.Z1“ Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss) dargestellt. Für die Aufnahmen diente das Objektiv „Plan-Apochromat 60x/1.40 Oil DIC“ (Zeiss). Für das Imaging der Zellen wurden diese auf Glasbodenschälchen (WellCo) ausgesät. Für die Fluoreszenz wurden verschiedene Filtereinsätze gewählt. GFP-getaggte Proteine wurden mit dem Filtersatz „Lot Nr. 38 HE“ (Zeiss) durch die Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Das dsRED reagiert bei Anregung ebenfalls mit der Emission von Licht, welches mit dem Filter (Filter-Nr. F46-005, AHF Analysentechnik AG) erkennbar war. Als letztes wurde zusätzlich ein blauer Filter (Filter Set 49) verwendet, der im Bereich der DAPI Färbung verwendet wird. Dieser wurde für die Darstellung des ER Tracker DPX verwendet (Abbildung 3.16, türkis). Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Hilfe der angeschlossenen 12bit „AxioCam MRm“ (Zeiss). Die Analyse der Bilder erfolgte mittels der Software „AxioVision Rel 4.8“ (Zeiss).

2.5.2 Imaging der primären kortikalen Neurone

Die Primärkulturen der kortikalen Neurone wurden von embryonalen Ratten (E16) gewonnen und mit einer Zelldichte von 200000 Zellen/Well (24 Well Platten) auf Polylysin-beschichtete Deckgläschen ausgesät. Als Medium wurde das Neurobasal A Medium (Invitrogen) verwendet, das mit 2% B27, 1 µg/µl Gentamycin, 2 mM Glutamax und 5% FBS supplementiert wurde. Nach 4 Stunden wurde dieses Medium gegen Neurobasal Medium mit 1,2 mM Glutamin, 2% B27 (20 ml/l) und Penicillin/Streptomycin (0,1 mg/ml) ausgetauscht. Dieses Medium wurde zur Kultivierung der Zellen verwendet. Die Zellen wurden nach drei Tagen mit VAPB-HA oder VAPB-P56S-HA unter der Verwendung von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit 4% PFA fixiert und mit Antikörpern gefärbt (Kapitel 2.1.22). Die Bilder wurden an einem konfokalen Lasermikroskop „Leica SP5“ (Leica) mit einem 63 x 1,4 NA Objektiv mit Nutzung einer Ölimmersion aufgenommen. Zur Detektion der Grünfärbung wurde ein 505-530 Bandpassfilter eingesetzt und mit 488 nm bzw. 543 nm angeregt. Die Färbungen mit dem Alexa 568 Antikörper (rot) wurden bei 620 nm angeregt und die Emission mittels eines 690nm Langpassfilter detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Die Familie der VAP-Proteine und Proteine des SNARE-Komplexes interagieren mit dem HCN2-Kanal

Strukturen innerhalb von Ionenkanälen, als auch Modulatoren haben einen Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften. So können die Leitfähigkeit, die Stromgröße, das „Gating“ oder auch Trafficking beeinflusst sein. Nachdem ich mich mit dem Einfluss von elektrophysiologisch relevanten Strukturen innerhalb des HCN-Kanalproteins beschäftigt habe (Wemhöner et al. 2012, Wemhöner et al. 2015), konzentrierte ich mich auf den Einfluss von Modulatoren auf die Funktion des HCN-Kanals.

3.1.1 Nachweis der indirekten Protein-Protein Interaktion der GST-Fusionsproteine und dem HCN2-Kanal

Eine vorherige Studie zeigte eine elektrophysiologische Relevanz des VAPB-Proteins auf die Stromamplitude des HCN2-Kanals (Walecki 2011). Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde das VAPB-Protein mittels eines Hefe-Zwei-Hybridexperiments als möglicher Interaktionspartner identifiziert. Hefeexperimente gelten in der Molekularbiologie und Proteinbiochemie jedoch nicht als verifizierter Nachweis für eine Protein-Protein-Interaktion. Als etablierte Methoden gelten in diesem Zusammenhang Ko-Immunopräzipitationen oder GST (Glutathion-S-Transferase)-„Pulldowns“. In dieser Arbeit wurde sich für die Proteininteraktion mittels GST-Proteinen entschieden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Protein-Protein Interaktion des VAPB-Proteins mit dem HCN2-Kanal in einem eukaryotischen Expressionssystem nachgewiesen werden. Bei den hierfür verwendeten Zellkulturzellen handelt es sich um HeLa-Zellen, die von einem humanen Cervixkarzinom stammen. Diese Zellen wurden mit HCN2 eGFP transfiziert und ein Zelllysate gewonnen. Bei einer Interaktion des GST-VAPB mit dem HCN2-Kanal sollte bei einer Immundetektion das HCN2-Protein im „Pulldown“ nachweisbar sein. Nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Western Blots identifiziert. Die Nitrozellulosemembran wurde mit einem α -GFP Antikörper inkubiert und anschließend die Proteine mittels eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen. In Abbildung 3.1A ist der „GST-Pulldown“ mit dem GST-VAPB-Protein und dem HCN2-Protein aus HeLa-

Zellen dargestellt. Der Western Blot verfügt über drei Spuren. In der ersten Spur wurde ein „GST-Pulldown“ mit lediglich in BL21-induziertem GST-Protein aufgetragen. Dieser „Pulldown“ dient als Kontrolle, um auszuschließen, dass es sich um eine unspezifische Interaktion zwischen dem GST-Protein und dem HCN2-Kanal handelt. In der zweiten Spur von links ist der „GST-Pulldown“ mit dem GST-VAPB-Protein aufgetragen worden. Dort ist im Vergleich zur ersten Spur (Kontrolle negativ, kein Binden des HCN2-Kanals an das GST-Protein) eine deutlich erkennbare Doppelbande auf der Höhe zwischen 130 kDa und 170 kDa zu erkennen. Hierbei handelt es sich um den eGFP-markierten HCN2-Kanal. Das HCN2-Protein ist als Doppelbande erkennbar, da es als glykosylierte und nicht glykosylierte Form im HeLa Lysat vorliegt. Die Glykosylierung des Kanals dient der Kontrolle des „Traffickings“ des HCN2-Kanals zur Zellmembran (Much et al. 2003). Als Positivkontrolle diente die dritte Spur. Sie enthielt lediglich das im „Pulldown“ eingesetzte Zelllysate (transfiziert mit HCN2 eGFP). Das GST-VAPB Protein ist daher in der Lage, den HCN2-Kanal aus einem Zelllysate zu binden. Der Nachweis der Protein-Protein Interaktion war daher erfolgreich (Abbildung 3.1A).



Abbildung 3.1 Die getesteten GST-Fusionsproteine zeigen eine nachweisbare Interaktion mit dem HCN2-Kanal

A Western Blot des „GST-Pulldowns“ mit GST-VAPB und HCN2-Protein aus HeLa-Zellen. Deutlich zu erkennen ist eine Doppelbande auf derselben Höhe wie die Kontrolle (Input – HCN2 HeLa Lysat, Pfeilkopf). Nachgewiesen wurde mittels eines α -GFP Erstantikörpers und einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Das GST-VAPB ist in der Lage, den HCN2-Kanal aus einem Zelllysate zu binden. Als Kontrolle wurde das GST-Protein alleine verwendet. Im Falle der Kontrolle konnte kein Binden des HCN2-Kanals an das GST-Protein beobachtet werden. **B** Protein-Protein-Interaktionstest mit dem Familienmitglied VAPA und den Interaktionspartnern VAMP1 und VAMP2. Der Versuch erfolgte nach demselben Schema wie der Nachweis mit dem GST-VAPB-Protein. Alle drei Fusionsproteine (GST-VAPA, GST-VAMP1 und GST-VAMP2) zeigten eine spezifische Interaktion mit dem HCN2-Kanal aus dem HeLa Lysat. In allen drei Fällen war eine Doppelbande vergleichbar mit der Input-Kontrolle nachzuweisen.

In der Einleitung wurden in den Kapiteln 1.3.1 und 1.3.2 weitere Familienmitglieder der VAP-Familie und Interaktionspartner der VAP-Familie beschrieben. Neben den Experimenten mit dem VAPB-Protein wurden die „GST-Pulldown“-Experimente ebenfalls mit dem Familienmitglied VAPA sowie den Interaktionspartnern VAMP1 und VAMP2 durchgeführt. VAPA weist, trotz einer unterschiedlichen Aminosäuresequenz, ein hohes Maß an struktureller Ähnlichkeit zum VAPB-Protein auf, da es ebenfalls über die drei Domänen MSP, CC und TM verfügt. Die Proteine VAMP1 und VAMP2 sind

Teil des SNARE Komplexes und sind in der Literatur als Interaktionspartner der VAP-Proteine beschrieben (Skehel et al. 1995). Entsprechend wurden diese Proteine zusätzlich zum VAPB-Protein auf eine Interaktion mit dem HCN2-Kanalprotein untersucht. Für alle getesteten Fusionsproteine, das heißt VAPA, VAMP1 und VAMP2 (Abbildung 3.1B), konnte eine Proteininteraktion mittels Antikörperfärbung nachgewiesen werden. Sie zeigten nach der Antikörperfärbung jeweils eine Doppelbande, die der des Inputs (HCN2-Zelllysate) glich. VAPA, VAMP1 und VAMP2 binden, wie das VAPB-Protein, den glykosylierten (~ 150 kDa) und den nicht glykosylierten HCN2-Kanal (~ 120 kDa).

3.1.2 Das VAPB-Protein interagiert nativ mit dem HCN2-Kanal im „GST-Pulldown“-Experiment

In den vorherigen Experimenten dieser Arbeit wurde für die „GST-Pulldowns“ ein HCN2-Konstrukt verwendet, bei dem es sich um ein GFP-markiertes Protein handelt. Somit verfügt das HCN2-Protein über eine veränderte Aminosäuresequenz, im Vergleich zu einem nativ exprimierten HCN2-Kanal. Zusätzlich könnten aufgrund der massiven Überexpression des Proteins in den HeLa-Zellen unspezifische Interaktionen zwischen dem GST-VAPB-Protein und dem HCN2-Kanal auftreten. Um diese Faktoren auszuschließen, wurde der Versuch unter nativen Bedingungen erneut durchgeführt. Hierzu wurde ein Lysat der Ratte (Gehirn) verwendet, das einen nativen Anteil des HCN2-Kanals enthält (Monteggia et al. 2000). Der Versuchsablauf wurde in Kapitel 2.1.19 beschrieben. Allerdings wurde zur Detektion des Proteins nun ein α -HCN2 Antikörper verwendet, der mittels eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers nachgewiesen werden konnte.

In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen konnte sowohl mit VAPB als auch mit VAPA, VAMP1 und VAMP2, der HCN2-Kanal im „Pulldown“ gebunden und anschließend detektiert werden (Abbildung 3.2). Die Negativkontrolle des GST-Proteins zeigte keine unspezifische Interaktion mit dem nativen HCN2-Kanal (Abbildung 3.2, Spur rechts).

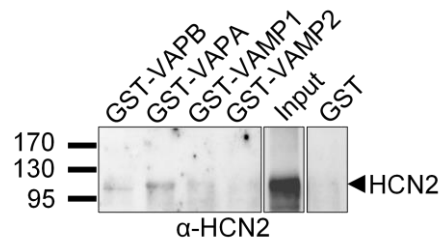


Abbildung 3.2 „GST-Pulldown“ mit endogenem HCN2-Protein zeigte eine spezifische Interaktion mit allen getesteten GST-Fusionsproteinen

Nach der Durchführung des „Pulldowns“ mit GST-VAPB, GST-VAPA, GST-VAMP1 und GST-VAMP2 zeigte sich im Western Blot eine Interaktion für alle getesteten Proteine. Die GST-Kontrolle (rechte Spur) war negativ. Die Positivkontrolle (Input, eingesetztes Lysat aus Gehirn) wurde deutlich kürzer belichtet (1 Minute) als die Pulldown-Experimente und anschließend wieder zu einem Bild zusammengefügt. Die GST-Kontrolle und auch die restlichen „Pulldowns“ wurden für 20 Minuten belichtet. Im Falle von GST-VAPB, GST-VAPA, GST-VAMP1 und GST-VAMP2 sind deutliche Banden auf Höhe der HCN2-Bande der Positivkontrolle zu erkennen. Die Interaktion mit dem VAMP2-Protein fiel hierbei am schwächsten und die mit dem VAPA-Protein am deutlichsten aus.

Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Interaktion der GST-Proteine unspezifisch durch die massive Überexpression und die veränderte Aminosäuresequenz ist. Eine Proteininteraktion des HCN2-Kanals mit VAPB, VAPA konnte somit nachgewiesen werden. Eine schwache Interaktion wurde ebenfalls mit VAMP1 und VAMP2 beobachtet.

3.1.3 Bei der Interaktion mit den GST-Fusionsproteinen handelt es sich um direkte Interaktionen mit dem HCN2-Kanal

Im Rahmen dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass es sich bei der Interaktion zwischen dem VAPB-Protein und HCN2-Kanal um eine direkte Bindung handelt. Allerdings kann durch die zuvor durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden, dass diese Interaktion indirekt über weitere Proteine vermittelt wurde. Sowohl im Zelllysate aus transfizierten Zellen, als auch aus Zellmaterial gewonnenem Proteinlysate sind neben den zu untersuchenden Proteinen immer auch weitere Proteine enthalten. Damit lediglich die beiden Proteine im Versuchsaufbau vorhanden sind, deren Interaktion nachgewiesen werden soll, müssen die Lysate aufgereinigt werden. Im Falle des HCN2-Proteins wurde eine *in vitro*-Translation als Lösung gewählt. Mittels entsprechender Enzyme und Substrate wird die DNA-Information des Plasmids in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Das Bakterienlysate ist durch das Binden des GST-Fusionsproteins an die „Beads“ aufgereinigt. Mehrere Waschschritte ermöglichen eine hohe Reinheit des gebundenen GST-Fusionsproteins, sodass davon ausgegangen werden kann, dass keine weiteren unspezifischen Proteine aus dem Bakterienlysate im Versuchsansatz vorhanden sind (Die Reinheit der GST-Fusionsproteine erfolgte mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese, Daten nicht gezeigt).

Diese aufgereinigten Proteine wurden anschließend statt eines Gewebe- oder Zelllysates im „Pulldown“ eingesetzt. In der Abbildung 3.3 ist das Ergebnis des „Pulldowns“ mit dem *in vitro*-translatiertem HCN2-Kanal dargestellt. Das HCN2-Protein wurde mittels α -HCN2 Antikörper auf der Nitrozellulosemembran nachgewiesen. Deutlich zu erkennen ist, dass für alle eingesetzten GST-Fusionsproteine eine direkte Interaktion mit dem HCN2-Kanal nachweisbar war. Die Input-Kontrolle enthält die *in vitro*-Translation des HCN2, welche für die „Pulldown“-Experimente eingesetzt wurde. Auf gleicher Höhe sind bei den „Pulldowns“ für GST-VAPB, GST-VAPA, GST-VAMP1 und GST-VAMP2 Banden zu erkennen, bei denen es sich um den HCN2-Kanal handelt. Lediglich die Negativkontrolle mit dem GST-Protein weist keine Bande auf (Spur ganz links). In diesem Versuchsaufbau ist nur eine Bande für das HCN2-Protein zu erkennen. Hierbei handelt es sich um die nicht glykosylierte Form des HCN2-Kanals. Durch die *in vitro*-Translation fehlen die entsprechenden Enzyme zur Glykosylierung des Proteins, sodass lediglich eine Bande auf dem Western Blot detektierbar war. Die zweite Bande im Input könnte auf Degradation des Proteins zurückzuführen sein (Abbildung 3.3).

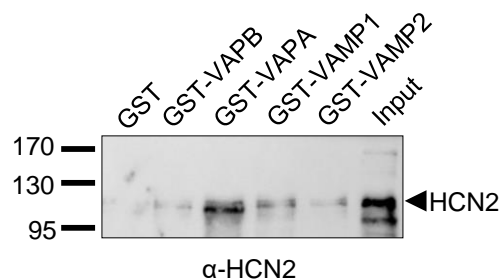


Abbildung 3.3 *In vitro*-translatiertes HCN2-Protein interagiert mit den GST-Fusionsproteinen

Die durchgeführten „Pulldowns“ zeigen eine direkte Interaktion mit *in vitro*-translatiertem HCN2-Protein. Die GST-Kontrolle zeigte keine Interaktion mit dem HCN2-Kanal (Spur links). Die Interaktion mit dem HCN2-Kanal weist unterschiedliche Intensitäten auf. Insbesondere die Interaktion mit dem VAPA-Protein zeigte eine deutliche Bande, sodass dieses eine hohe Affinität für den HCN2-Kanal aufweist. Das VAPB-, VAMP1- und VAMP2-Protein interagieren ebenfalls mit dem HCN2-Kanal.

Die „GST-Pulldown“-Experimente zeigten eine Protein-Protein Interaktion zwischen dem HCN2-Kanal und dem VAPB-Protein sowie dem VAPA-, VAMP1- und VAMP2-Protein. Bei dieser Interaktion handelt es sich um eine direkte Interaktion. Die direkte Interaktion mit dem VAPA-Protein zeigte eine höhere Affinität zum HCN2-Kanal als das VAPB-Protein.

3.1.4 Das VAPB- Protein liegt in einem Komplex mit dem VAPA-Protein und dem HCN2-Kanal vor

In der Literatur ist beschrieben, dass das VAPB- und VAPA-Protein miteinander interagieren und ein Heteromer bilden (Lev et al. 2008). Daher war es von großem Interesse nachzuweisen, ob diese Proteine gemeinsam mit dem HCN2-Kanal in einem Komplex vorliegen.

Um eine Komplexbildung nachzuweisen, wurde ein „Pulldown“ mit dem GST-VAPA-Protein durchgeführt. Für den Nachweis wurden mit HCN2 eGFP transfizierte Zellen verwendet, aus welchen ein Proteinlysate mittels der im Kapitel 2.1.14 beschriebenen Methodik gewonnen wurde. In diesem Lysat befindet sich auch endogen exprimiertes VAPB-Protein (Uhlén et al. 2015). Als Negativkontrolle diente das GST-Protein (Spur 1, oben und unten). Als Kontrollen wurden das HCN2-Lysat (Spur 4, oben) und ein HeLa Lysat transfiziert mit VAPB pCDNA3.1 (Spur 3, unten) verwendet. Der Western Blot wurde nach dem Auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese geteilt und mit zwei unterschiedlichen Antikörpern inkubiert. Der Bereich, in dem sich das GFP-markierte HCN2-Protein befindet (100-170 kDa), wurde mit einem α -GFP Antikörper inkubiert. Der Abschnitt, in dem sich das VAPB-Protein befinden sollte, wurde mit einem α -VAPB Antikörper inkubiert. Die Banden wurden anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. In Abbildung 3.4 ist das Ergebnis des „Pulldowns“ dargestellt. Der „Pulldown“ mit dem GST-VAPA-Protein zeigt eine Interaktion zwischen dem GST-VAPA und dem HCN2-Kanal (Spur 2, oben). Zusätzlich ist eine Bande auf Höhe des VAPB-Proteins zu erkennen (Spur 2, unten). Das VAPA-Protein bindet somit neben dem HCN2-Kanal (Spur 2, oben) auch das VAPB-Protein (Spur 2, unten).

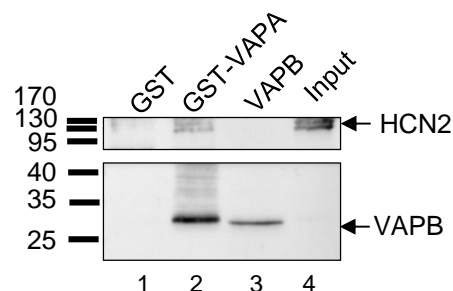


Abbildung 3.4 Das VAPB-Protein liegt im Komplex mit dem HCN2- und dem VAPA-Protein vor

Der Western Blot zeigt, dass das VAPB-Protein mit dem VAPA- und HCN2-Protein in einem Komplex vorliegt. Das GST-VAPA-Protein ist in der Lage, neben dem HCN2-Kanal auch das VAPB-Protein zu binden (Spur 2, oben und unten). Die Negativkontrolle (GST-Protein, Spur 1) zeigte keine Interaktion mit dem HCN2-Kanal und dem VAPB-Protein. Als Kontrollen zur Größenbestimmung dienten ein HeLa Lysat mit transfiziertem VAPB (Spur 3, unten) und das in dem „Pulldown“ eingesetzte HCN2-Lysat (Spur 4, oben).

Das VAPB-Protein interagiert nachweislich direkt mit dem HCN2-Kanal (Abbildung 3.1A) und dem VAPA-Protein (Lev et al. 2008, Abbildung 3.4). Da das VAPA-Protein jedoch ebenfalls direkt an den HCN2-Kanal bindet (Abbildung 3.3) könnten diese drei Proteine in einer Art Komplex vorliegen und vermutlich auf diese Weise die Stromamplitude des HCN2-Kanals modulieren.

3.2 Elektrophysiologische Untersuchungen bei einer Ko-Expression des VAPB-Proteins

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass das VAPB-Protein bei einer Ko-Expression mit dem HCN2-Kanal dessen Stromamplitude in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration des VAPB-Proteins moduliert (Walecki 2011, Kapitel 1.4.2). Ein Ziel dieser Arbeit war die weitergehende elektrophysiologische Charakterisierung des Einflusses des VAPB-Proteins auf den HCN2-Kanal. Hierzu wurden 7,5 ng/Oozyte HCN2 cRNA mit je 1 ng/Oozyte, 3 ng/Oozyte oder 9 ng/Oozyte VAPB-Protein in *Xenopus laevis* Oozyten ko-exprimiert. In den weitergehenden Kapiteln wurde ebenfalls mit diesen Mengen gearbeitet und die elektrophysiologischen Untersuchungen mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (TEVC) durchgeführt. Zur Ermittlung der Spannungsabhängigkeit des HCN2-Kanals wurden die Oozyten zunächst auf ein Haltepotential von -30 mV geklemmt. Anschließend wurde das Strom-Spannungsverhältnis mittels Pulsen à zwei Sekunden bei verschiedenen Potentialen gemessen. Hierzu wurde in 10 mV Schritten das Potential von -30 mV bis -140 mV erniedrigt, gefolgt von einem Testpuls bei -130 mV für 750 ms (Abbildung 3.5A). Beim Testpuls von -130 mV wurden sogenannte „Tail-Currents“ aufgezeichnet. Diese wurden normalisiert und gegen die Spannung aufgetragen und anschließend die $V_{1/2}$ mittels der Boltzmann Funktion ausgewertet. Dieses Protokoll wird im Folgenden als „Messprotokoll für Strom-Spannungsverhältnisse“ bezeichnet.

3.2.1 Die Aktivierungskinetik und Spannungsabhängigkeit des HCN2-Kanals werden nicht durch das VAPB-Protein moduliert

In den TEVC Messungen wurde die $V_{1/2}$, d.h. die halbmaximale Spannungsabhängigkeit und die Zeitkonstante der Aktivierung Tau (τ) bestimmt und die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.5 zusammengefasst. Die Messungen erfolgten mit dem Messprotokoll für Strom-Spannungsverhältnisse (Abbildung 3.5A). Ein Beispielstrom einer HCN2-Kanal Messung ist in Abbildung 3.5A zu erkennen. Der Strom weist hierbei die typischen Merkmale eines HCN-Stromes auf. Bei einem Haltepotential von -30 mV ist der Kanal geschlossen, die anschließende Messung bei verschiedenen negativen Potentialen zeigt die Spannungsabhängigkeit in Bezug auf die Öffnung des Kanals. Je negativer das angelegte Potential, desto mehr Strom fließt über die Membran. Der HCN2-Kanal verfügt über zwei Aktivierungskomponenten. Zum einen eine sehr kleine instantane Komponente, welche innerhalb von Millisekunden vollständig aktiviert und zum anderen eine langsame Komponente, die den Großteil der Stromamplitude ausmacht (Biel et al. 2009).

Der Kanal öffnet ab einem Potential von circa -60 mV und die Stromamplitude nimmt während der Erniedrigung des Potentials bis -140 mV zu. Der Strom zeigt keine spannungsabhängige Inaktivierung. Beim nachfolgenden Sprung des Potentials auf -130 mV werden die „Tail-Currents“ aufgezeichnet. Diese dienen zur Bestimmung der Leitfähigkeit des Kanals. Bei einer Spannung von -130 mV hat der Kanal seine maximale Leitfähigkeit erreicht. In der Abbildung 3.5B sind die Ergebnisse der Auswertung der $V_{1/2}$ grafisch zusammengefasst für den HCN2-Kanal (schwarz) und die Ko-Expression mit VAPB (dunkelblau). Mit einer halbmaximalen Aktivierung ($V_{1/2}$) von $-86,0 \pm 0,2$ mV ($n=20$) für die Wildtyp HCN2-Expression zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zur $V_{1/2}$ bei einer Ko-Expression mit 1 ng VAPB ($V_{1/2}$ $-84,9 \pm 0,3$ mV, $n=30$) (Abbildung 3.5B).

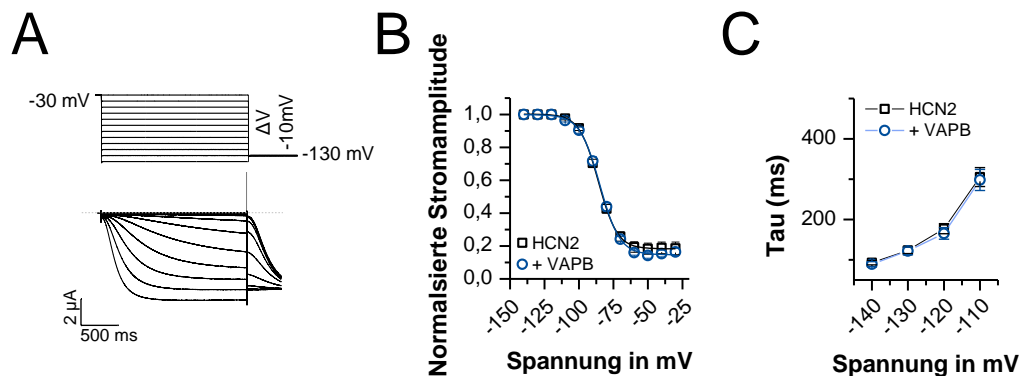


Abbildung 3.5 Die Spannung der halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals und die Geschwindigkeit der Aktivierung werden nicht durch das VAPB-Protein beeinflusst

A Darstellung des Messprotokolls für Stromspannungsmessungen mit entsprechendem Beispielstrom eines gemessenen HCN2-Stroms, welcher den typischen Stromverlauf eines HCN2-Stroms aufweist. Der Kanal weist eine spannungsabhängige Öffnung bei negativen Potentialen auf. „Tail-Currents“ dienen der Ermittlung der Strom-Spannungsbeziehung. **B** Auswertung der Spannungsabhängigkeit der HCN2 Expression (schwarz) und der Ko-Expression mit 1 ng VAPB (dunkelblau). Hierzu wurden die normalisierten Stromamplituden (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Spannung (X-Achse) aufgetragen. Folgende $V_{1/2}$ Werte ergaben sich: HCN2: $-86,0 \pm 0,2$ mV ($n=20$); HCN2 + 1 ng VAPB: $-84,9 \pm 0,3$ mV ($n=30$). Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. **C** Auswertung der Zeitkonstanten τ in Abhängigkeit von der Spannung für HCN2 (schwarz) und die Ko-Expression mit VAPB (dunkelblau). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Geschwindigkeit der Aktivierung.

Zusätzlich wurde die Aktivierungskinetik des HCN2-Kanals ohne und bei Anwesenheit des VAPB-Proteins untersucht. Hierzu wurden durch die Erstellung von monoexponentiellen Ausgleichskurven die Zeitkonstanten der Aktivierung (τ in ms) bei verschiedenen Spannungen ermittelt. Die Auswertung der Geschwindigkeit der Aktivierung ergab die in der nachfolgenden Tabelle 3.1 zusammengefassten Werte und ist in Abbildung 3.5C grafisch dargestellt.

Spannung in mV	HCN2		HCN2 + VAPB	
	τ in ms	SEM	τ in ms	SEM
-140	92,8	5,2	89,5	6,0
-130	123,5	7,9	122,0	9,3
-120	177,4	12,5	165,6	14,3
-110	305,3	23,4	298,1	26,2

Tabelle 3.1 Übersicht über die Ergebnisse der Aktivierungskinetik

Mittelwerte der τ -Werte des HCN2-Kanals oder der Ko-Expression mit dem VAPB-Protein bei den Spannungen von -140 mV bis -110 mV mit dem entsprechenden Fehler der Standardabweichung (SEM). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Zeitkonstanten des exprimierten HCN2-Kanals in Oozyten und der Ko-Expression mit dem VAPB-Protein nachgewiesen werden.

Die Messungen des HCN2-Kanals ohne das VAPB-Protein ergaben τ -Werte vergleichbar mit der Literatur (Moosmang et al. 2001). Gleiches galt für die Ko-Expression des HCN2-Kanals mit dem VAPB-Protein, sodass abschließend neben der bereits beschriebenen Modulation der Stromamplitude des HCN2-Kanals keine elektrophysiologische Veränderungen der Stromeigenschaften festgestellt werden konnten.

3.2.2 Die pharmakologischen Eigenschaften des HCN2-Kanals werden durch das VAPB-Protein nicht verändert

Um den Einfluss des VAPB-Proteins auf die pharmakologischen Eigenschaften des HCN2-Kanals zu prüfen, wurde der HCN-Kanalblocker ZD7288 (BoSmith et al. 1993) verwendet. Für die Experimente wurde das Messprotokoll für „Strom-Spannungsverhältnisse“ verwendet (Abbildung 3.5A). Die Experimente wurden jeweils für den HCN2-Kanal alleine und für die Ko-Expression mit dem VAPB-Protein durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit derselben Oozyte vor Applikation und während der Applikation des Blockers ZD7288. Verwendet wurde eine Konzentration von 30 μ M ZD7288, die sich im Bereich der Konzentration für halbmaximale Inhibition des HCN2-Kanals (IC_{50}) befindet (Cheng et al. 2007). Exemplarisch sind Beispielströme für den HCN2-Kanal und die Ko-Expression mit VAPB bei einem Potential von -110 mV vor und nach Applikation des Blockers abgebildet (Abbildung 3.6A). In der Abbildung 3.6B wurde der prozentuale Anteil des Blocks gegen die Spannung aufgetragen. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass der Block durch ZD7288 spannungsabhängig verläuft. Er schwankt zwischen 10 und 58% für den HCN2-Kanal sowie für die Ko-Expression mit dem VAPB-Protein. Den stärksten Block erhält man bei einer Spannung von -70 mV mit 58% für den HCN2-Kanal und bei -80 mV für die Ko-Expression mit VAPB mit einem Wert von 56%. Der spannungsabhängige Block zeigte keine Unterschiede zwischen der Wildtyp-HCN2-Expression (Block in Prozent

zwischen 13% und 58%) und der Ko-Expression mit VAPB, bei welcher der Block zwischen 10% und 55% variierte (Abbildung 3.6B). Die $V_{1/2}$ liegt bei HCN2 vor der Applikation von ZD7288 bei $-74,9 \text{ mV} \pm 0,2 \text{ mV}$ ($n=4$). Während der Applikation von $30 \mu\text{M}$ ZD7288 verschiebt sich diese um circa -15 mV zu negativeren Potentialen. Im Falle der Ko-Expression des HCN2-Kanals mit dem VAPB-Protein lag die $V_{1/2}$ vor der Applikation des ZD7288 bei $-74,9 \text{ mV} \pm 0,2 \text{ mV}$ ($n=5$). Nach dem Einwaschen der Substanz verschob sich die $V_{1/2}$ ebenfalls zu negativeren Potentialen ($-92,5 \text{ mV} \pm 1,9 \text{ mV}$, $n=5$) (Abbildung 3.6C).

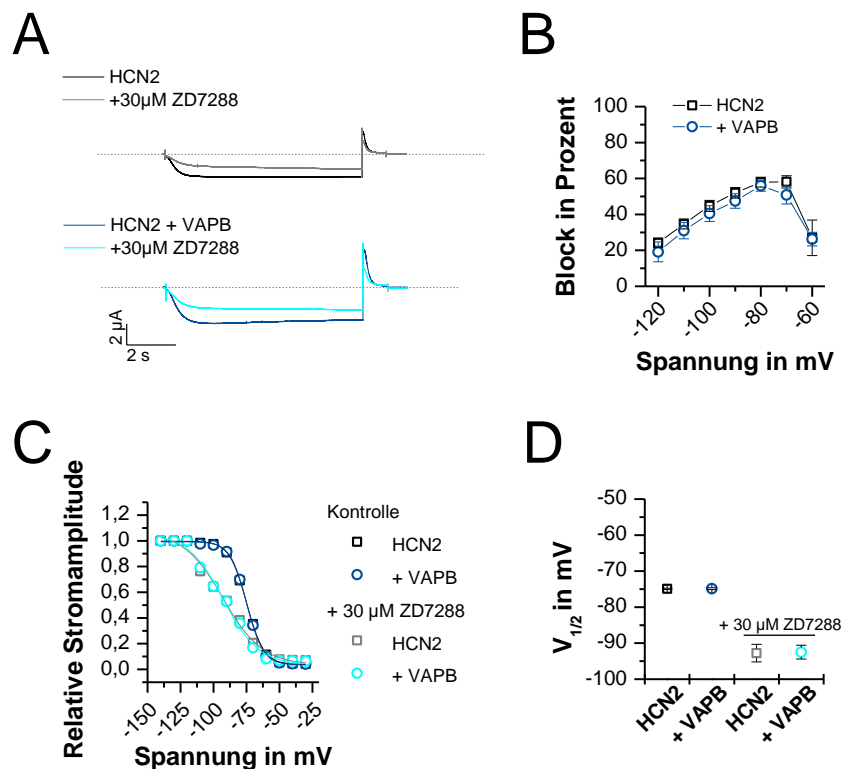


Abbildung 3.6 Das VAPB-Protein hat keinen Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften des HCN2-Kanals

A Beispielströme bei -110 mV vor und während der Applikation von ZD7288 für HCN2 Wildtyp (schwarz, grau) und HCN2 + 1 ng VAPB (dunkelblau, türkis) zeigen keine signifikanten Unterschiede. **B** Auswertung des Blocks in Prozent (Y-Achse) in Abhängigkeit von der Spannung (X-Achse) für die HCN2-Wildtyp-Expression (schwarz) und die Ko-Expression mit VAPB (dunkelblau). Es konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen HCN2 und HCN2 + 1 ng VAPB in Abhängigkeit von der Spannung beobachtet werden. **C** Die Auswertung der Strom-Spannungsabhängigkeit erfolgte für die HCN2 Expression (schwarz, grau) und die Ko-Expression (dunkelblau, türkis) mittels der Boltzmann-Funktion. **D** Es ergaben sich folgende $V_{1/2}$ Werte: HCN2 vor Applikation (schwarz): $-74,9 \text{ mV} \pm 0,2 \text{ mV}$ ($n=4$); während Applikation (grau): $-92,7 \pm 2,4 \text{ mV}$ ($n=4$). Für die Ko-Expression mit dem VAPB-Protein wurden folgende $V_{1/2}$ Werte ermittelt: vor Applikation (dunkelblau): $-74,9 \pm 0,2 \text{ mV}$ ($n=5$); während Applikation (türkis): $-92,5 \pm 1,9 \text{ mV}$ ($n=5$).

3.2.3 Die Modulation des HCN2-Kanals durch das VAPB-Protein ist HCN-selektiv

In Kapitel 1.4.2 wurde bereits auf die Selektivität der Modulation der Stromamplitude durch das VAPB-Protein innerhalb der HCN-Familie hingewiesen. In einer vorhergehenden Studie wurde bereits gezeigt, dass der Kv1.1-Kanal und der Kir2.1-Kanal nicht durch das VAPB-Protein moduliert werden (Walecki 2011). In dieser Arbeit wurden elektrophysiologische Messungen in *Xenopus laevis* Oozyten mit weiteren Ionenkanälen durchgeführt. Hierzu wurde das „Messprotokoll für Einzelamplituden“ (Kapitel 3.2) verwendet. Die einzelnen Messwerte wurden auf den Mittelwert des jeweiligen Wildtyps normiert. Hierzu wurden Kv1.4, Kv1.5, Kv4.3 und KCNQ1 cRNAs mit jeweils 1 ng VAPB ko-exprimiert und mit der entsprechenden Wildtyp-Expression verglichen. Keiner der getesteten Ionenkanäle zeigte eine veränderte Stromamplitude in Präsenz von VAPB (Abbildung 3.7).

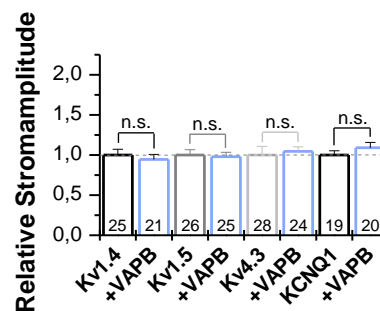


Abbildung 3.7 Das VAPB-Protein ist nicht in der Lage die Stromamplitude anderer Ionenkanäle zu modulieren

Keiner der getesteten Ionenkanäle zeigte eine Interaktion mit dem VAPB-Protein. Bei einer Ko-Expression mit dem VAPB-Protein blieb eine Modulation der Stromamplitude aus. Die Messungen ergaben folgende Werte: Kv1.4: $1,0 \pm 0,1$ (n=25), + 1 ng VAPB $0,9 \pm 0,1$ (n=21); Kv1.5: $1,0 \pm 0,1$ (n=26), + 1 ng VAPB $1,0 \pm 0,1$ (n=25); Kv4.3: $1,0 \pm 0,1$ (n=28), + 1 ng VAPB $1,1 \pm 0,1$ (n=24); KCNQ1: $1,0 \pm 0,1$ (n=19), + 1 ng VAPB $1,1 \pm 0,1$ (n=20).

Daher kann neben der Selektivität des VAPB-Proteins für HCN1 und HCN2 zusammenfassend mit den vorherigen Ergebnissen (Walecki 2011) eine sehr hohe Spezifität des VAPB-Proteins für die HCN-Kanals Familie festgestellt werden.

3.2.4 Die VAP-Familienmitglieder zeigen unterschiedliche Effekte auf den HCN2-Strom

Wie im Kapitel 1.3.1 beschrieben, ist das VAPB-Protein Teil der sogenannten Familie der VAP-Proteine. Neben dem VAPB-Protein sind das VAPA und die alternative Spleißform VAPC beschrieben. Da diese Proteine über einen ähnlichen strukturellen Aufbau verfügen, war es von großem Interesse, die Modulation des HCN2-Kanals durch das VAPA- und VAPC-Protein zu untersuchen.

Das VAPA-Protein wird durch ein separates Gen codiert und verfügt daher über eine abweichende Aminosäuresequenz gegenüber dem VAPB-Protein. Es weist jedoch weiterhin die drei Domänen MSP, CC und TM auf. Zur Erfassung der Daten wurde das Messprotokoll für „Strom-Spannungsverhältnisse“ (Abbildung 3.5A) verwendet. In den Experimenten zeigte sich, dass die Stromamplitude des HCN2-Kanals durch das VAPA-Protein in niedrigen Konzentrationen (1 ng/Oozyte) signifikant erhöht wurde. Bei einer Ko-Expression mit 9 ng VAPA kam es, wie bei einer Ko-Expression mit 9 ng VAPB, zu einer Stromreduktion des HCN2-Kanals (Abbildung 3.8B).

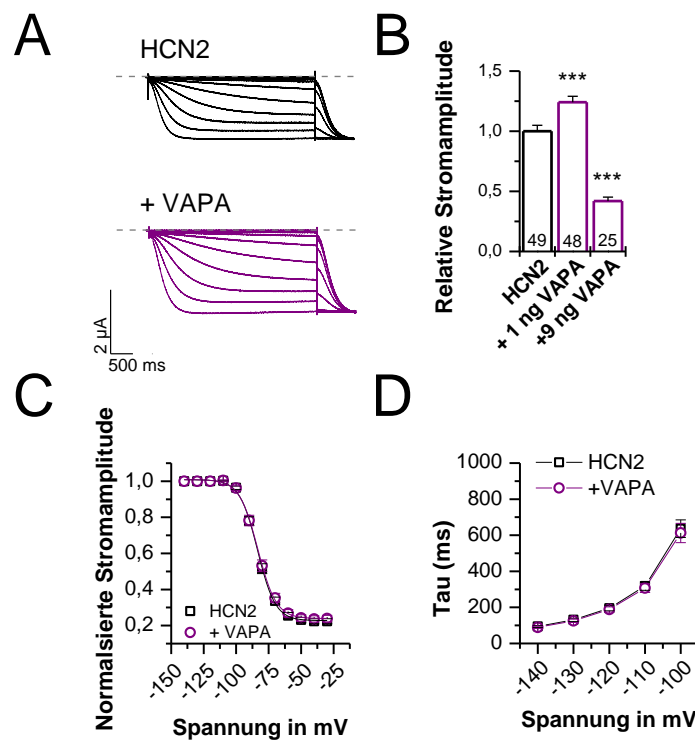


Abbildung 3.8 Die Stromamplitude des HCN2-Kanals wird durch VAPA konzentrationsabhängig moduliert

A Die Abbildung zeigt die Beispielströme und die dazugehörigen relativen Stromamplituden der HCN2-Wildtyp Expression (schwarz) im Vergleich zur Ko-Expression mit 1 ng VAPA (lila). **B** Die Auswertung der Stromamplituden ergab folgende relative Stromamplituden für HCN2 (schwarz): $1,0 \pm 0,1$ ($n=49$), HCN2 + 1 ng VAPA (lila): $1,3 \pm 0,1$ ($n=48$), HCN2 + 9 ng VAPA (lila): $0,4 \pm 0,03$ ($n=25$). Das VAPA-Protein weist eine ähnliche Modulation der Stromamplitude wie das VAPB-Protein auf. **C** Das VAPA-Protein hat keinen Einfluss auf die $V_{1/2}$ des HCN2-Kanals. Die Stromspannungskurve bleibt bei einer Ko-Expression mit dem VAPA-Protein (lila) unverändert. Es ergaben sich bei der Bestimmung der $V_{1/2}$ mittels Boltzmann-Funktion folgende Werte: HCN2 (schwarz): $-83,5 \pm 0,4$ mV ($n=13$) und HCN2 + VAPA (lila): $-83,3 \pm 0,4$ mV ($n=12$). **D** Bestimmung der Zeitkonstanten der Aktivierung des HCN2-Kanals (schwarz) und der Ko-Expression mit VAPA (lila). Die Auswertung erfolgte bei den Spannungen -140 mV bis -100 mV. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem HCN2-Kanal (schwarz) und der Ko-Expression mit VAPA (lila) beobachtet werden.

Neben der Modulation der Stromamplitude wurde auch die $V_{1/2}$ des HCN2-Kanals in Abhängigkeit von der Konzentration des VAPA-Proteins untersucht. Zwischen der $V_{1/2}$ des HCN2 und der $V_{1/2}$ der Ko-Expression mit 1 ng VAPA konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 3.8C). Die Zeitkonstante Tau (τ) wurde, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, mittels monoexponentiellen Ausgleichskurven bestimmt. Die Geschwindigkeit der Aktivierung zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen dem HCN2-Kanal und einer Ko-Expression mit dem VAPA-Protein (Abbildung 3.8D). Die vollständige Auswertung mit den einzelnen Mittelwerten der Zeitkonstanten τ mit steigendem Potential sind in der nachfolgenden Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Spannung in mV	HCN2		+ VAPA	
	τ in ms	SEM	τ in ms	SEM
-140	93,7	5,4	89,3	5,8
-130	130,9	8,6	125,5	9,00
-120	195,3	13,9	188,3	14,4
-110	318,0	23,5	306,9	24,4
-100	636,3	48,5	612,6	53,3

Tabelle 3.2 Übersicht über die Aktivierungskinetik bei einer Ko-Expression mit VAPA

Auswertung der mittleren Zeitkonstanten τ in Abhängigkeit von der Spannung für den HCN2-Kanal ($n=12$) und die Ko-Expression mit VAPA ($n=12$) zeigte keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Spannung. Die Bestimmung erfolgte mittels monoexponentiellen Ausgleichsgeraden für die Spannungen -140 mV bis -100 mV. Neben den Zeitkonstanten wurde der Fehler der Standardabweichung (SEM) des jeweiligen Mittelwerts bestimmt.

Wie bereits erwähnt, ist neben dem VAPA-Protein ist auch das VAPC-Protein ein Mitglied der VAP-Proteinfamilie. Das VAPC-Protein und das VAPB-Protein werden durch das gleiche Gen codiert und unterliegen einem alternativen Spleißen. Das VAPC-Protein zeichnet sich durch ein verfrühtes Stoppcodon aus, dass zu einer verkürzten Proteinvariante führt. Es verfügt im Gegensatz zu VAPA und VAPB lediglich über die MSP- und CC-Domäne jedoch nicht über eine Transmembrandomäne, sodass es sich um ein zytosolisches Protein handelt. Das VAPC-Protein wurde ebenfalls auf eine Modulation der Stromamplitude des HCN2-Kanals untersucht. Hierzu wurde das VAPC-Protein mit dem HCN2-Kanal in *Xenopus laevis* Oozyten ko-exprimiert und die relativen Stromamplituden, sowie die $V_{1/2}$ bestimmt. Es zeigte sich, dass das VAPC-Protein im Vergleich zu VAPA und VAPB nicht in der Lage war, die Stromamplitude zu modulieren. Weder zeigten niedrige Konzentrationen (1 ng und 3 ng) eine Stromamplitudenvergrößerung, noch waren hohe Konzentrationen in der Lage, die Stromamplitude zu verringern. Ebenfalls unverändert blieb die $V_{1/2}$ der Ko-Expression mit VAPC im Vergleich zum HCN2-Kanal (Abbildung 3.9). Die Auswertung mittels Boltzmann-Funktion ergab keinen signifikanten Unterschied für die $V_{1/2}$ des HCN2-

Kanals im Vergleich zu den Ko-Expressionen mit dem VAPC-Protein bei steigender Konzentration.

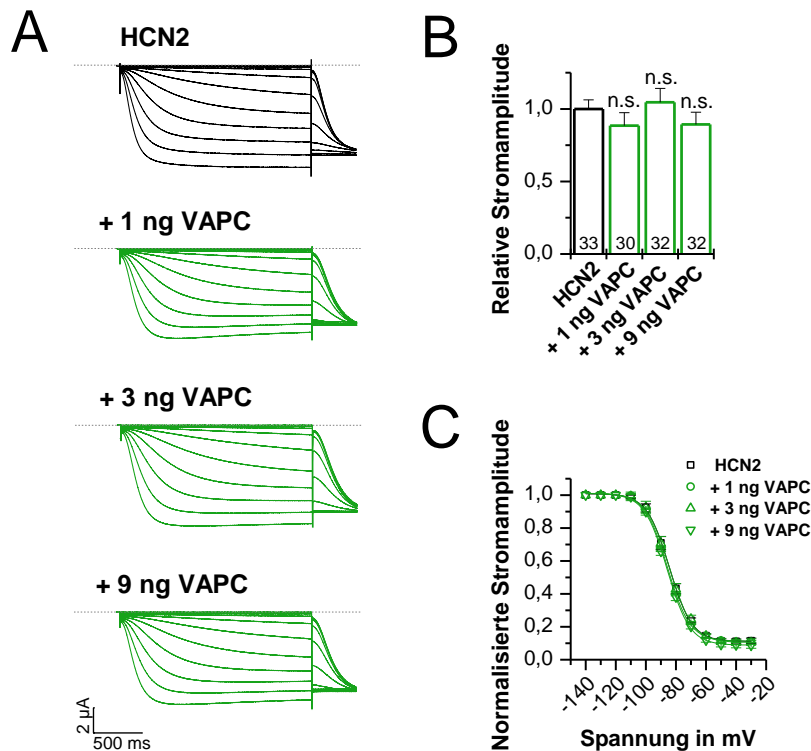


Abbildung 3.9 Das VAPC-Protein hat keinen Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des HCN2-Kanals

A Die Abbildung stellt exemplarische Beispielströme der HCN2-Kanal Expression in den *Xenopus laevis* Oozyten im Vergleich zu den Ko-Expressionen mit dem VAPC-Protein bei verschiedenen Konzentrationen (grün) dar. **B** Die Daten mehrerer Messtage und Expressionen wurden auf die mittlere HCN2-Stromamplitude normiert und miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass eine Ko-Expression von VAPC in verschiedenen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Stromamplitude hat. Es ergaben sich folgende Mittelwerte mit dem entsprechenden Fehler der Standardabweichung: HCN2: $1,0 \pm 0,1$ (n=33), HCN2 + 1 ng VAPC: $0,9 \pm 0,1$ (n=30), HCN2 + 3 ng VAPC: $1,1 \pm 0,1$ (n=32), HCN2 + 9 ng VAPC: $0,9 \pm 0,1$ (n=32). **C** Die grafische Auswertung umfasst die mittels Boltzmann-Formel bestimmten $V_{1/2}$ Werte für die HCN2-Kanal Expression (schwarz) und die Ko-Expressionen mit dem VAPC-Protein (grün). Es ergaben sich folgende Werte für die $V_{1/2}$: HCN2: $-84,4 \pm 0,3$ mV (n=33), HCN2 + 1 ng VAPC: $-85,7 \pm 0,4$ mV (n=30), HCN2 + 3 ng VAPC: $-84,2 \pm 0,4$ mV (n=32), HCN2 + 9 ng VAPC: $-85,9 \pm 0,3$ mV (n=32).

Die Modulation des HCN2-Kanals weist innerhalb der VAP-Familie deutliche Unterschiede auf. Während das VAPB- und VAPA-Protein die Stromamplitude des HCN2-Stroms konzentrationsabhängig modulieren, ist das VAPC-Protein nicht in der Lage, mit dem HCN2-Protein zu interagieren. Somit scheint die Struktur des VAP-Proteins eine essentielle Rolle bei der Interaktion mit dem HCN2-Kanal zu haben. Insbesondere die Transmembrandomäne muss eine übergeordnete Rolle spielen, da sich das VAPB und VAPA Protein in ihrer Aminosäuresequenz der MSP- und CC-Domänen unterscheiden.

3.2.5 Interaktionspartner der VAP-Proteinfamilie interagieren ebenfalls mit dem HCN2-Kanal und modulieren dessen Stromamplitude

In Kapitel 1.3.2 wurden bereits einige der bekannten Interaktionspartner des VAPA- und VAPB-Proteins erwähnt. Im vorhergehenden Kapitel 3.1 wurden VAMP1 und VAMP2 als weitere Interaktionspartner des HCN2-Kanals mittels GST-„Pulldown“-Experimenten verifiziert, sodass sich die elektrophysiologischen Untersuchungen dieser Arbeit auf diese beiden Interaktionspartner beschränken. In der Literatur ist beschrieben, dass sowohl VAPB, als auch VAPA mit Synaptobrevin (VAMP-Proteine) interagieren (Skehel et al. 1995).

Das VAMP1-Protein zeigte in den TEVC-Messungen eine Modulation der Stromamplitude, vergleichbar mit VAPB und VAPA (Abbildung 3.5 und Abbildung 3.8). Die niedrige Konzentration an VAMP1 führt zu einer signifikanten Erhöhung der Stromamplitude, während die Ko-Expression mit einer hohen Konzentration zu einer Stromreduktion führte. Die mittlere Konzentration an VAMP1-Protein zeigte keine Modulation auf die Stromamplitude (Abbildung 3.10A). Die $V_{1/2}$ wurde durch die Ko-Expression in unterschiedlichen Konzentrationen von VAMP1 ebenfalls nicht moduliert (Abbildung 3.10B). Die Auswertung mittels Boltzmann-Funktion ergab keine signifikanten Unterschiede.

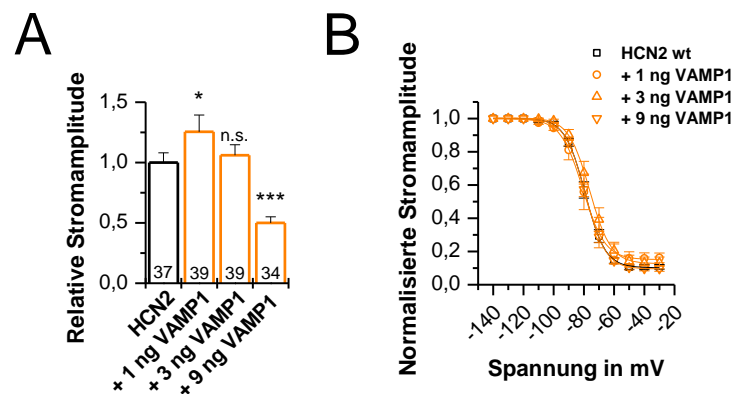


Abbildung 3.10 Das VAMP1-Protein moduliert die HCN2-Stromamplitude konzentrationsabhängig

A Darstellung der relativen Stromamplituden der VAMP1 Ko-Expressionen in verschiedenen Konzentrationen (orange) im Vergleich zum HCN2-Kanal (schwarz). Bei der Auswertung ergaben sich folgende Mittelwerte der Stromamplitude mit dem Fehler der Standardabweichung: HCN2(schwarz): $1,0 \pm 0,1$ (n=37), HCN2 + 1 ng VAMP1 (orange): $1,3 \pm 0,1$ (n=39), HCN2 + 3 ng VAMP1 (orange): $1,1 \pm 0,1$ (n=39), HCN2 + 9 ng VAMP1 (orange): $0,5 \pm 0,1$ (n=34). **B** Ergebnis der $V_{1/2}$ Auswertung mittels der Boltzmann-Funktion. Für HCN2 (schwarz) ergab sich eine $V_{1/2}$ von $-79,2 \pm 0,2$ mV (n=5), für HCN2 + 1 ng VAMP1 (orange) $-80,7 \pm 0,2$ mV (n=3), für HCN2 + 3 ng VAMP1 (orange) $-76,1 \pm 0,2$ mV (n=6) und für HCN2 + 9 ng VAMP1 (orange) $-79,1 \pm 0,1$ mV (n=5). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die $V_{1/2}$ Daten.

Im Vergleich dazu zeigte eine Ko-Expression des HCN2-Kanals mit dem VAMP2-Protein ein konträres Ergebnis und reduzierte die Stromamplitude des HCN2-Kanals in der mittleren und hohen Konzentration. Die niedrige Konzentration des VAMP2-Proteins hingegen hatte keinen Effekt auf die Stromamplitude des HCN2-Kanals (Abbildung 3.11A). Die $V_{1/2}$ wurde durch eine Ko-Expression des VAMP2-Proteins in unterschiedlichen Konzentrationen nicht signifikant verändert (Abbildung 3.11B).

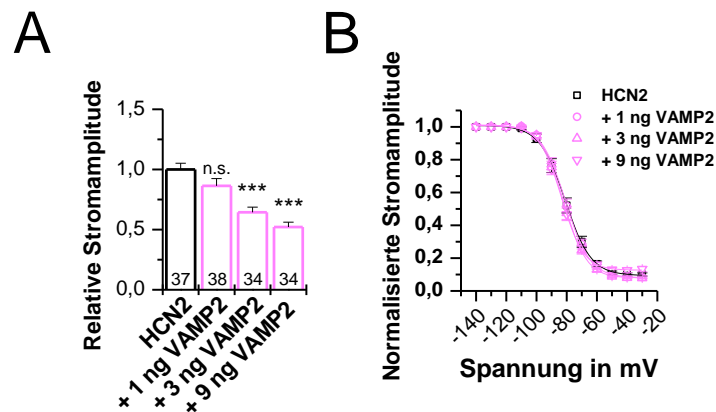


Abbildung 3.11 VAMP2 hat keinen Einfluss auf die Stromamplitude des HCN2-Kanals bei einer geringen Überexpression

A Balkendiagramm der relativen Stromamplituden des HCN2-Kanals (schwarz) und den Ko-Expressionen in den unterschiedlichen Konzentrationen (rosa) zeigt die konzentrationsabhängige Modulation der Stromamplitude durch das VAMP2-Protein. Die Auswertung ergab folgende mittlere Stromamplituden mit dem Fehler der Standardabweichung: HCN2: $1,0 \pm 0,1$ ($n=37$), HCN2 + 1 ng VAMP2: $0,9 \pm 0,1$ ($n=38$), HCN2 + 3 ng VAMP2: $0,6 \pm 0,04$ ($n=34$), HCN2 + 9 ng VAMP2: $0,5 \pm 0,04$ ($n=34$). Die Stromamplitude wurde durch das VAMP2-Protein in mittlerer und hoher Konzentration signifikant reduziert. Eine niedrige Konzentration des VAMP2-Proteins hat keinen Einfluss auf die HCN2-Stromamplitude. **B** Darstellung der normalisierten Stromamplitude (Y-Achse) gegen die Spannung (X-Achse) zur Ermittlung der $V_{1/2}$. Für die Expression des HCN2-Kanals (schwarz) ergab sich folgender Wert: $-81,0 \pm 0,3$ mV ($n=24$). Die Ko-Expressionen zeigten keine signifikanten Veränderungen in ihrer $V_{1/2}$ (rosa, Anordnung mit steigender Konzentration): $-80,8 \pm 0,4$ mV ($n=23$), $-82,1 \pm 0,3$ mV ($n=25$), $-83,4 \pm 0,3$ mV ($n=22$).

Die Ergebnisse der Ko-Expressionen zeigten, dass auch innerhalb der Familie der VAMP-Proteine Unterschiede in Bezug auf die Modulation des HCN2-Kanals herrschen. So können die Interaktionspartner neben einer konzentrationsabhängigen Stromamplitudenvergrößerung (VAMP1) auch lediglich eine Stromreduktion (VAMP2) bei einer starken Überexpression verursachen. Somit scheint die Interaktion des HCN2-Kanals mit dem VAMP2-Protein stark von dessen Expressionslevel beeinflusst zu sein.

3.2.6 ALS8 assoziiertes VAPB-P56S ist in der Lage die Stromamplitude des HCN2-Kanals zu modulieren

In der Literatur ist eine Punktmutation des VAPB, das VAPB-P56S, beschrieben, welches eine Substitution des Prolins zu einem Serin an der Position 56 aufweist (Kanekura et al. 2006). Es zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass es Aggregate bildet und dabei auch noch vorhandenes Wildtyp-VAPB rekrutieren kann (siehe Kapitel 1.3.3). Bei diesen Messungen wurden lediglich die Stromamplituden bei -130 mV mit dem „Messprotokoll für Einzelamplituden“ erfasst. In einer vorherigen Studie konnte gezeigt werden, dass das VAPB-P56S nicht mehr in der Lage ist, das HCN2-Kanalprotein zu modulieren (Walecki 2011). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser Effekt konzentrationsabhängig ist. Während das VAPB-P56S-Protein bei niedriger Konzentration seine Fähigkeit zur Modulation auf den HCN2-Kanal verliert, ist es weiterhin in der Lage, die Stromamplitude des HCN2 bei hohen Konzentrationen zu erniedrigen ($0,5 \pm 0,04$; $n=35$; hellblau). Die Ergebnisse der TEVC Messungen sind in der Abbildung 3.12 grafisch dargestellt.

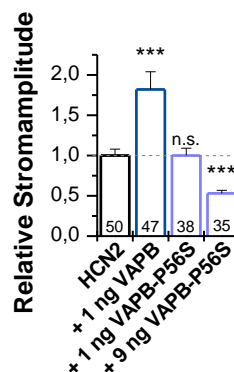


Abbildung 3.12 Das VAPB-P56S ist partiell in der Lage, die Stromamplitude des HCN2-Kanals zu modulieren

Übersicht über die Ko-Expression von HCN2 mit VAPB und VAPB-P56S. Die Daten aus einer vorangegangenen Studie zeigten, dass die Ko-Expression mit 1 ng VAPB ($1,4 \pm 0,1$; $n=39$) zu der üblichen Amplitudenvergrößerung, während eine Ko-Expression mit VAPB-P56S zu einem Ausbleiben der Amplitudenerhöhung führt (Walecki 2011). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser Effekt konzentrationsabhängig ist und das VAPB-P56S sehr wohl in der Lage ist, die Stromamplitude des HCN2-Kanals zu modulieren: HCN2-Kanal (schwarz): $1,0 \pm 0,1$ ($n=39$). Die Ko-Expression mit 9 ng VAPB-P56S zeigte eine Stromreduktion ($0,5 \pm 0,04$; $n=35$).

Das VAPB-P56S-Protein ist assoziiert mit der neurodegenerativen Erkrankung ALS8. Durch die in dieser Arbeit festgestellte partielle Modulation des HCN2-Kanals kann eine Beteiligung des HCN2-Kanals an der Entstehung des Krankheitsbildes der ALS8 nicht ausgeschlossen werden. Das VAPB-P56S-Protein könnte aufgrund seiner Selektivität bei unterschiedlichen Konzentrationen einen zellspezifischen Effekt aufweisen.

3.2.7 Ein Komplex aus VAPB- und VAPA-Protein erhöht die Stromamplitude des HCN2-Kanals

Die „Pulldown“-Experimente wiesen auf eine Komplexbildung zwischen dem HCN2-Kanal, VAPB- und VAPA-Protein hin (Kapitel 3.1.4). Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden das VAPB- und VAPA-Protein zu gleichen Teilen eingesetzt. Bei der Bestimmung der Stromamplitude zeigte sich, dass es bei einer Ko-Expression des Komplexes zu einer circa zweifachen Erhöhung der Stromamplitude des HCN2-Kanals kommt (Abbildung 3.13).

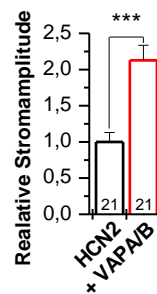


Abbildung 3.13 Die Ko-Expression mit einem Komplex aus VAPB- und VAPA-Protein führt zu einer Vergrößerung der Stromamplitude des HCN2-Kanals

Bei einer Ko-Expression des HCN2-Kanals (schwarz) mit dem Komplex (rot) kommt es zu einer Vergrößerung der Stromamplitude. Die relativen Stromamplituden waren: HCN2 ($1,0 \pm 0,1$, $n=21$) und HCN2 + VAPB/B ($2,1 \pm 0,2$, $n=21$). Die Vergrößerung der Stromamplitude ist signifikant.

Die elektrophysiologischen Daten der Ko-Expression mit dem Komplex aus VAPB/B-Protein, sowie die Ergebnisse aus den „Pulldown“-Experimenten legen nahe, dass die Modulation des HCN2-Kanals durch den Komplex vermittelt wird. Die beiden Proteine sind ubiquitär exprimiert und könnten gemeinsam zum Effekt beitragen.

3.3 Der Einfluss des VAPB-Proteins auf die Distribution des HCN2-Proteins nach Ko-Transfektion in Säugetierzellen

3.3.1 Das VAPB- und das VAPB-TM Protein ko-lokalisieren mit dem HCN2-Kanal

Bisher ungeklärt blieb die zelluläre Lokalisation des HCN2-Proteins unter Einfluss von VAPB. Entsprechend sollte evaluiert werden, wie sich das VAPB-Protein und der HCN2-Kanal in einer typischen Zellkulturzelle verhalten. Für diese Experimente wurden „Chinese Hamster Ovary“ (CHO) Zellen verwendet. Neben dem Einfluss des VAPB-Proteins auf die Verteilung des HCN2-Kanals sollte auch nachgewiesen werden, in welchen Kompartimenten sich die jeweiligen Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten (6 und 24 Stunden) befinden. Zunächst sollte bestimmt werden, ob sich die Verteilung des HCN2-Proteins durch eine Ko-Expression mit VAPB-dsRed verändert. Hierzu wurde entweder HCN2 eGFP mit dsRED (Verhältnis DNA 1:1) oder HCN2 eGFP mit VAPB-dsRed transfiziert (1:1). Bei HCN2 eGFP handelt es sich um ein C-terminal mit eGFP markiertes Konstrukt. Durch die Translation von Fusionsproteinen mit GFP-Markierung oder dsRed-Markierung konnte ein „Live Cell-Imaging“ der Zellen durchgeführt werden. Das bedeutet, dass die Zellen für die Aufnahmen nicht mittels Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend mit Antikörpern gefärbt wurden. Deutlich zu erkennen ist, dass VAPB und der HCN2-Kanal sowohl nach 6 Stunden, als auch nach 24 Stunden ko-lokalisieren (Abbildung 3.14). Während beider Zeitpunkte wurden der HCN2-Kanal und das VAPB-Protein in einer mikrotubuli-ähnlichen Struktur nachgewiesen, bei dem es sich aber auch um das endoplasmatische Reticulum (ER) handeln könnte. Dies ist in der nachfolgenden Abbildung 3.14 dargestellt.

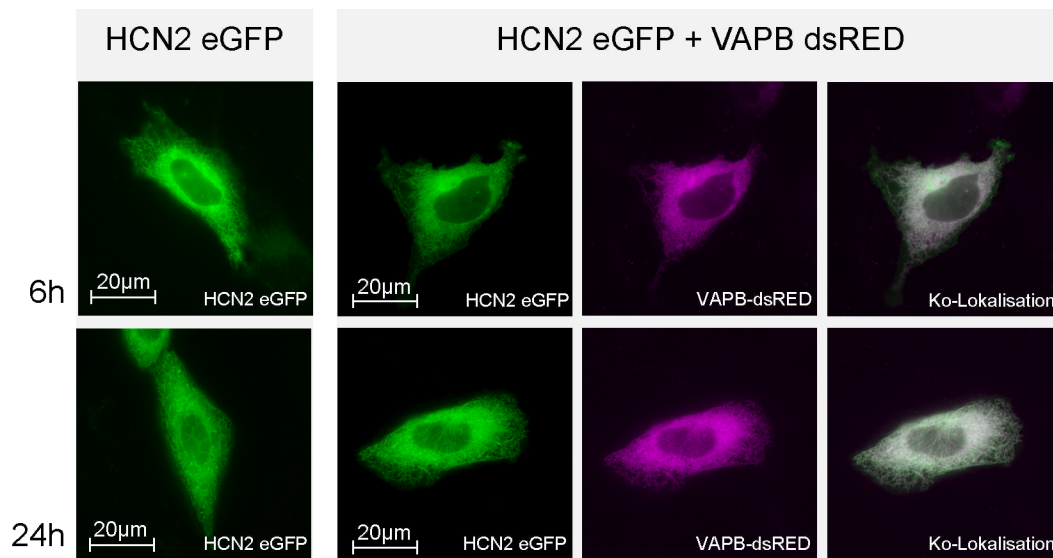


Abbildung 3.14 Das VAPB-Protein ko-lokalisiert in ER-ähnlicher Struktur mit dem HCN2-Kanal

„Live Cell-Imaging“ 6 Stunden oder 24 Stunden nach Transfektion. Entweder wurde HCN2 eGFP (+ dsRed) als Kontrolle (links) oder HCN2 eGFP mit VAPB-dsRed transfiziert (1:1) (rechts). Nach 6h und 24h konnte eine Ko-Lokalisation der beiden Proteine im Wesentlichen in einer ER beziehungsweise mikrotubuli-ähnlichen Struktur nachgewiesen werden.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt, um das ER zu identifizieren. Zum einen mittels eines ER-„Trackers“, der spezifisch das ER der Zellen anfärbt. Zum anderen wurde ein ER-Protein verwendet, das in einem dsRED Plasmid kodiert wird. Zunächst wurden die Experimente mit einem spezifischen ER-Protein durchgeführt, das an ein dsRed Monomer fusioniert ist. Dies hat den Nachteil, dass mittels des „Live Cell-Imagings“ lediglich die Lokalisation des HCN2-Proteins (eGFP markiert) kontrolliert werden kann. Statt der Verwendung eines VAPB-dsRed Plasmids wurde ein unmarkiertes VAPB verwendet. Die Auswertung der Bilder ergab, dass eine Ko-Transfektion mit dem VAPB-Protein keinen nennenswerten Unterschied in der Ko-Lokalisation des HCN2-Kanals mit dem ER verursacht und sich das HCN2-Protein im ER befindet (Abbildung 3.15).

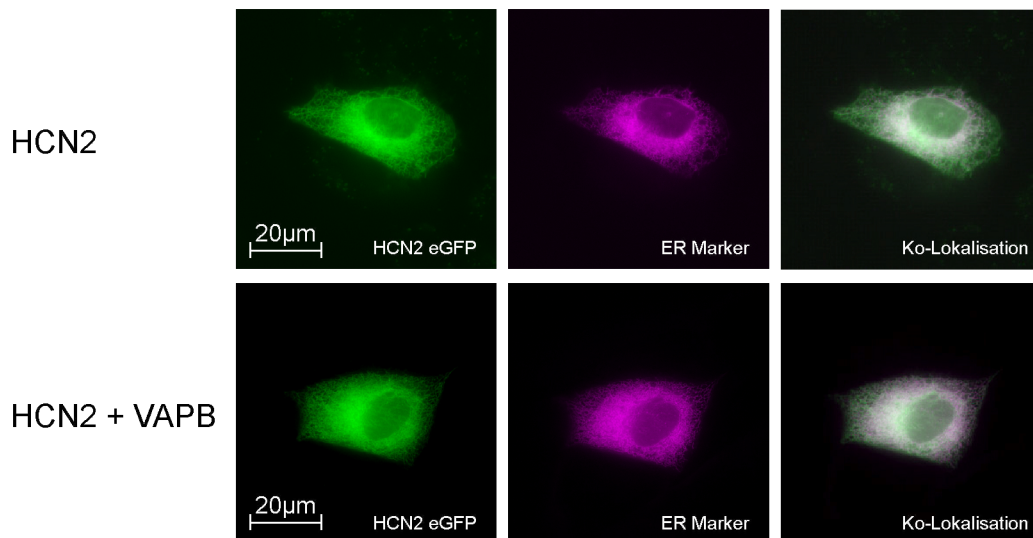


Abbildung 3.15 Der HCN2-Kanal befindet sich mit und ohne VAPB bevorzugt im ER der Zelle

Die Abbildung stellt die Zusammenfassung der Experimente mit dem ER Marker dar. Der ER Marker ist ein dsRed-fusioniertes ER-ständiges Protein. Es ist zu erkennen, dass unabhängig von der Ko-Transfektion mit VAPB (unten) das HCN2-Protein (C-terminal markiert mit eGFP) sich im ER befindet und mit dem ER Marker ko-lokalisiert. Dies gilt auch im Falle der Transfektion lediglich mit dem ER-Marker und dem Leervektor pcDNA3.1 (oben).

In Abbildung 3.16 ist das „Live Cell-Imaging“ der CHO-Zellen mit Färbung durch den ER-„Tracker“ zu sehen. Hierzu wurden die Zellen mit dem ER-„Tracker“ „Blue White DPX“ angefärbt. Im oberen Teil der Abbildung ist die Transfektion von HCN2 eGFP (C-terminal markiert) allein zu erkennen. Neben HCN2 wurde auch das leere dsRed Monomer transfiziert, um bei allen Transfektionen die gleiche Menge an Gesamt-DNA einzusetzen. Die Kontrollaufnahmen der dsRed-Färbung sind jedoch nicht abgebildet. Zu erkennen ist, dass das HCN2-Protein mit der Färbung des ER-„Trackers“ übereinstimmt und die Ko-Lokalisation durch eine hellere Grünfärbung deutlich wird (Abbildung 3.16 oben). Im mittleren Bereich der Abbildung ist die Ko-Transfektion von HCN2 eGFP und VAPB-dsRed dargestellt. Auch hier zeigt das HCN2-Protein eine Ko-Lokalisation mit dem ER-„Tracker“ (hellgrün) und auch eine Übereinstimmung des Expressionsmusters mit VAPB-dsRed (weiß). Eine noch deutlichere Übereinstimmung kann bei der Färbung mit dem ER-„Tracker“ und VAPB-dsRed beobachtet werden, was sich durch eine deutliche lila Färbung zeigt.

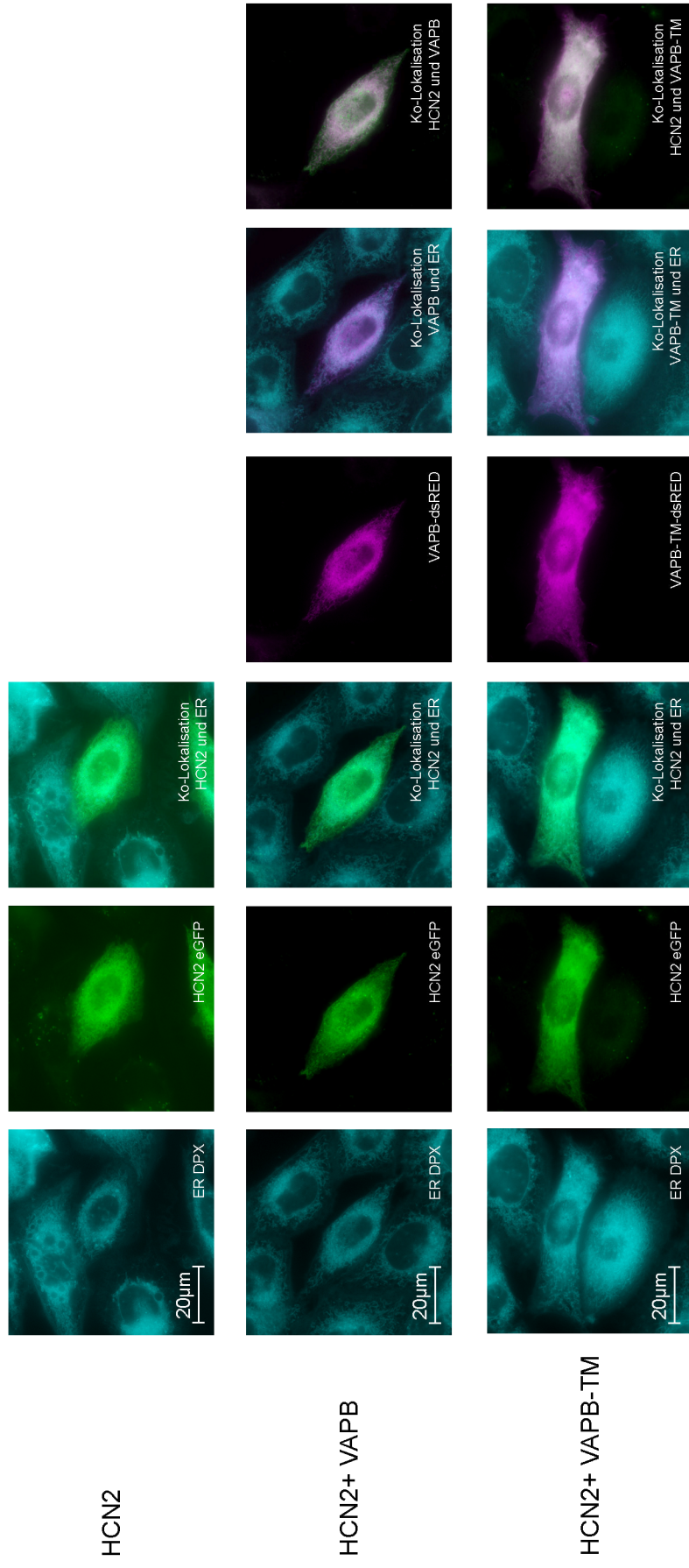


Abbildung 3.16 Das VAPB- und das VAPB-TM-Protein ko-lokalisiert mit dem Endoplasmatischen Retikulum und dem HCN2-Kanal

Zusammenfassung der Ergebnisse der Experimente 24 Stunden nach der Transfektion von HCN2 eGFP (C-terminal an eGFP fusioniert) mit dem Leervektor dsRed zur Kontrolle. Die Ko-Lokalisation des ERs mit dem HCN2-Kanal ist in hellgrün dargestellt. **MITTE:** Ko-Transfektion von HCN2 eGFP und VAPB-dsRED. HCN2 ko-lokalisiert mit ER (hellgrün) und VAPB (weiß). VAPB zeigt ebenfalls eine Übereinstimmung mit dem Muster des ER-Trackers[®] (Ko-Lokalisation in Ili). **UNTEN:** Ko-Transfektion mit lediglich der Transmembrandomäne des VAPB-Proteins (VAPB-TM) fusioniert an das dsRed Monomer und HCN2 eGFP. HCN2 eGFP ko-lokalisiert auch hier mit dem ER-Trackers[®] (hellgrün). Gleiches Verhalten bei VAPB-TM ko-lokalisieren (weiß) und zeigen eine ähnliche Distribution, wie das vollständige VAPB-Protein.

Allerdings zeigte sich, dass bei einer Ko-Transfektion von VAPB-TM-dsRED mit dem HCN2 eGFP zwar eine Ko-Lokalisation des ER-„Trackers“ auftritt, jedoch scheinen der HCN2-Kanal, als auch das VAPB-TM-Protein eine deutlich stärkere Membranfärbung zu erreichen. Dies fällt insbesondere bei der Betrachtung der Ko-Lokalisation von VAPB-TM und HCN2 eGFP auf (Abbildung 3.16, unten). Die Zelle weist eine deutlich gleichmäßigere Ko-Lokalisation über die gesamte Zelle auf im Vergleich zur Ko-Transfektion mit dem vollständigen VAPB-Protein (Abbildung 3.16, Mitte). Insbesondere das VAPB-TM-Protein scheint die Membran vermehrt zu erreichen, da eine deutlich stärkere Färbung in Magenta auftritt. Zur genaueren Bestimmung wurden die Ko-Transfektionen mit VAPB-TM zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 24 und 48 Stunden) wiederholt. Bei einer Ko-Expression des VAPB-TM-dsRed mit HCN2 eGFP (C-terminal markiert mit eGFP) ist deutlich zu erkennen, dass die Distribution des Proteins dahingehend verändert wird, dass es sich zwar im ER aufhält, jedoch vermehrt auch die Plasmamembran erreicht. Nach 6 Stunden befinden sich das VAPB-Protein und das HCN2-Protein im ER und ko-lokalisieren (weiß) (Abbildung 3.17, oben). Im Verlauf des Experimentes (24 und 48 Stunden) erhielt es eine gleichmäßigere Verteilung über die Zelle (Abbildung 3.17, Mitte und unten). Auch der HCN2-Kanal scheint dieser neuen Verteilung zu folgen und war weniger im ER aufzufinden.

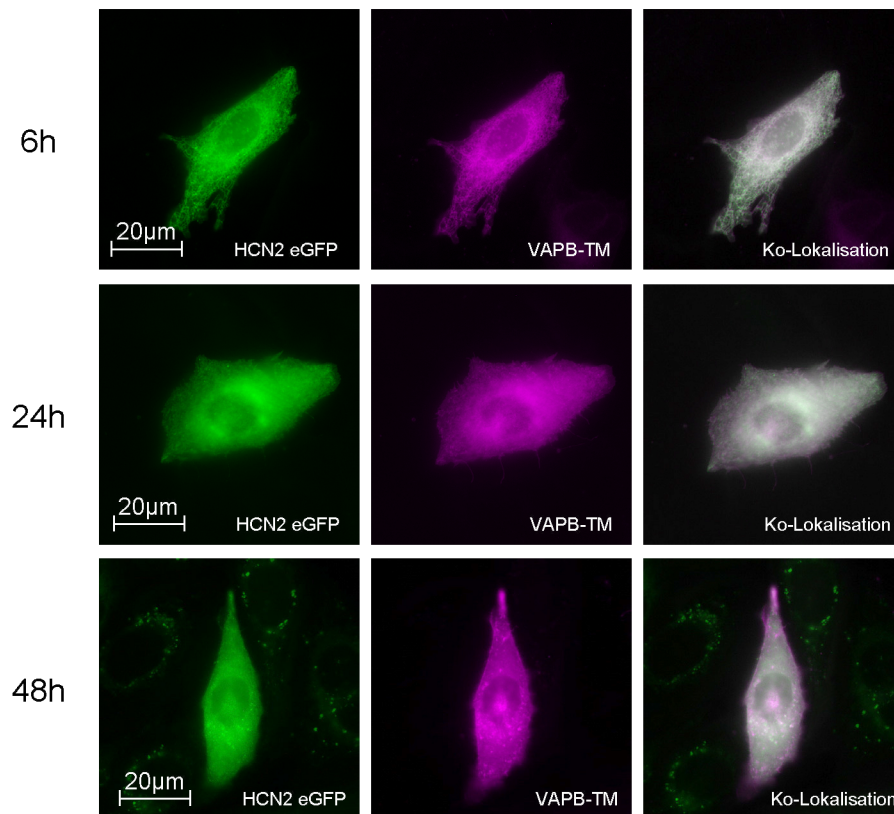


Abbildung 3.17 VAPB-TM zeigt zeitabhängige Ko-Lokalisation mit dem HCN2-Kanal an der Zellmembran

„Live Cell-Imaging“ 6 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden nach Transfektion. 6 Stunden nach Transfektion ist eine deutliche Ko-Lokalisation der beiden Proteine im ER nachweisbar. Nach 24 Stunden befindet sich sowohl das VAPB-TM-Protein, als auch der HCN2-Kanal (C-terminal an eGFP fusioniert) an der Zelloberfläche und sie haben die ER ähnliche Struktur verlassen. Auch 48 Stunden nach Transfektion veränderte sich die Distribution der Proteine nicht, sondern eine gleichmäßige Färbung der Zelle konnte beobachtet werden.

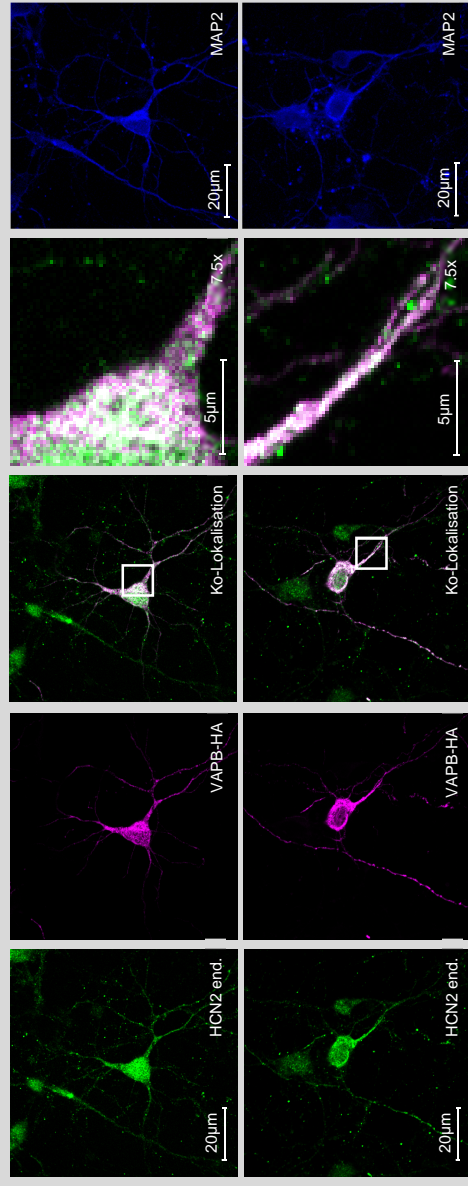
Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass das VAPB-Protein mit dem HCN2-Kanal im ER ko-lokalisiert und es Hinweise auf einen Einfluss des VAPB-Proteins auf die Verteilung des HCN2-Kanals in der Zelle gibt. Insbesondere die Transmembrandomäne scheint die Verteilung des HCN2-Kanals in der Zelle zu beeinflussen. Entsprechend wurden weitere Experimente in kortikalen Neuronen (Kapitel 3.3.12) und Oberflächenassays zur Bestimmung der Membranexpression durchgeführt (Kapitel 3.5).

3.3.2 Das VAPB-Protein beeinflusst die Distribution des nativen HCN2-Kanals in kortikalen Neuronen

Da die Verteilung eines Proteins stark abhängig vom untersuchten Zelltyp ist, sollten neben unpolaren Zellen, wie Zellkulturzellen (CHO), auch polare Zellen untersucht werden. Unter einer polaren Morphologie einer Zelle versteht man, dass es eine spezifische Ausrichtung der Zellstruktur gibt und entsprechend eine polare Distribution

von Proteinen vorherrscht. Eine solche Zelle ist zum Beispiel ein Neuron, das aufgrund seines Zellkörpers (Soma), sowie den Axonen und Dendriten eine Polarität aufweist. Für diese Experimente wurden transfizierte primäre kortikale Neurone verwendet. Kortikale Neurone exprimieren nativ HCN2, sodass es lediglich notwendig war, die Expression des VAPB-Proteins in den Zellen zu verändern. Dies lässt anschließend Rückschlüsse auf die Relevanz des VAPB-Proteins auf die Verteilung des endogenen HCN2-Kanals zu. Hierzu wurde ein HA-markiertes VAPB-Konstrukt in den Neuronen überexprimiert, welches anschließend, nach Fixierung der Nervenzellen, mit einer Antikörperfärbung nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse dieser Transfektion sind in Abbildung 3.18 im oberen Teil zusammengefasst. Zur Visualisierung der Dendriten und Zellkörper wurde eine MAP2 (Microtubule-associated protein 2) Antikörperfärbung (blau) angewandt. MAP2 bindet an das Tubulin der Mikrotubuli, welche ihrerseits das Zytoskelett von Zellen stabilisieren (Prosser et al. 2008). Auffällig war, dass es bei einer Transfektion mit VAPB-HA (magenta) zu einer deutlichen Ko-Lokalisation (weiß) mit dem endogenen HCN2 (grün) kommt (Abbildung 3.18, oben). Dies zeigte sich sowohl im Bereich des Somas, als auch im Bereich der Dendriten. Generell war die Verteilung des HCN2-Proteins in Folge der Überexpression des VAPB-HA-Proteins verändert.

HCN2 + VAPB-HA



HCN2 + VAPB P56S-HA

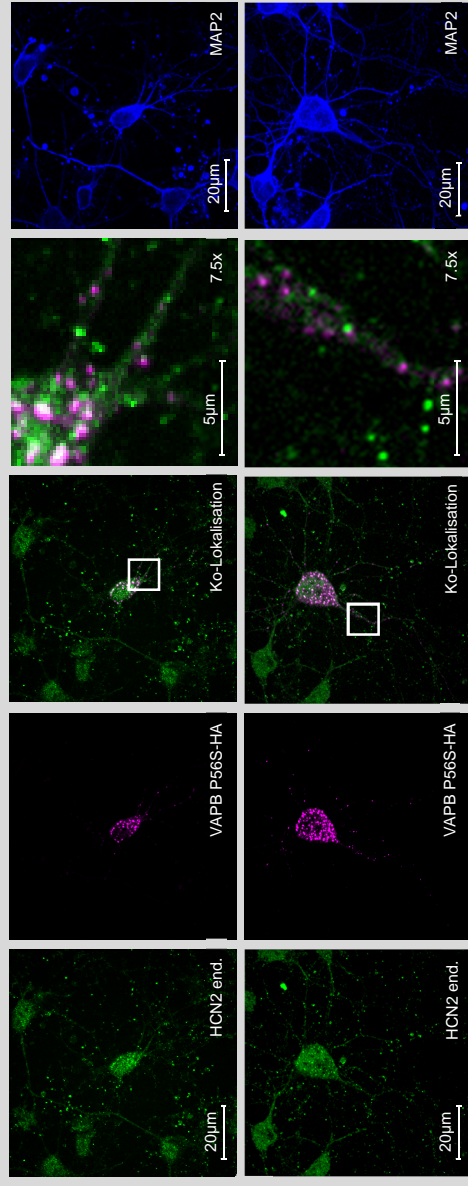


Abbildung 3.18 VAPB und VAPB-P56S haben einen Einfluss auf die Distribution des HCN2-Kanals in kortikalen Neuronen

Imaging der mit VAPB-HA oder VAPB-P56S-HA transfizierten primären kortikalen Neurone. In Grün dargestellt ist die Antikörperfärbung des endogenen HCN2. Im oberen Teil sind transfizierte VAPB-HA (magenta) und im unteren Teil das VAPB-P56S-HA (magenta) dargestellt. Eine Ko-Lokalisation des VAPB-HA mit dem HCN2-Kanal ist durch eine weiß Färbung deutlich zu erkennen, während das VAPB-P56S kaum Überlappung des Expressionsmusters zeigt. Zusätzlich wurde eine 7,5-fache Vergrößerung zur verbesserten Darstellung der Ko-Lokalisation gewählt. Zur Anfärbung des vollständigen Neurons wurde eine MAP2 Antikörperfärbung durchgeführt.

Bei einem Vergleich mit nicht transfizierten Nachbarzellen fiel auf, dass das HCN2-Kanal in den transfizierten Zellen gleichmäßiger verteilt und in allen Kompartimenten des Neurons nachweisbar war. Bei den nicht transfizierten Zellen war eine Konzentration des HCN2-Kanals im Soma zu beobachten und nur eine vereinzelte Färbung in den Dendriten in Form von einzelnen vesikelartigen Strukturen (Abbildung 3.18, oben). Die transfizierten Zellen dagegen wiesen zusätzlich eine verstärkte Färbung der Dendritenverzweigungen auf, sodass diese klar in grün zu erkennen waren (Abbildung 3.18, oben). Um einen partiellen Funktionsverlust des VAPB-Proteins zu simulieren, wurde ein VAPB-P56S-HA Konstrukt verwendet. Dieses zeichnet sich durch eine Aggregatbildung aus und führt zu einem fast vollständigen Funktionsverlust des VAPB-Proteins (Kanekura et al. 2006; Teuling et al. 2007). In der Literatur ist beschrieben, dass die Transfektion von hippocampalen Neuronen mit VAPB-P56S dazu führt, dass sie eine geringere Vitalität und eine veränderte Morphologie haben (Teuling et al. 2007). Um Veränderungen der Morphologie der hier verwendeten kortikalen Neurone beurteilen zu können, wurden die Neurone erneut mit einem α -MAP2 Antikörper immunhistochemisch angefärbt (blau). Zu erkennen ist zwar eine weniger ausgeprägte Verzweigung des Dendritenbaums, jedoch sind die Dendriten entgegen der Literatur (Teuling et al. 2007) nicht vollkommen rudimentär. Eine Verteilung des HCN2-Kanals wäre trotz der Rückbildung weiterhin in den verbliebenen Dendriten möglich. Durch die Transfektion des mutanten VAPB-Proteins konnte eine deutliche Aggregation des VAPB-P56S-Proteins innerhalb des Somas und wenigen Aggregaten in den Dendriten beobachtet werden (magenta) (Abbildung 3.18, unten). Bei einer Betrachtung des endogenen HCN2-Kanals fiel auf, dass dieses stark vesikulär auftritt, sich jedoch nicht mit den Aggregaten des VAPB-P56S überlagert. Die Distribution beschränkte sich ebenfalls im Wesentlichen auf eine Verteilung im Soma und wenige punktuelle Areale in den Dendriten (Abbildung 3.18, unten). Während bei der Transfektion mit VAPB-HA eine deutliche Ko-Lokalisation mit HCN2 zu erkennen war (weiß) (Abbildung 3.18, oben), so geht diese bei einer Expression des VAPB-P56S-HA Proteins fast vollständig verloren, insbesondere in den Dendriten (Abbildung 3.18, unten).

3.4 Das VAPB-Protein interagiert über den N-Terminus des HCN2-Kanals

3.4.1 Der C-Terminus des HCN2-Kanals ist nicht essentiell für die Interaktion mit dem VAPB-Protein

Stopp- oder Trunktionsmutanten sind Proteine, bei denen es aufgrund einer Punktmutation auf DNA Ebene zu einer terminierenden Veränderung der Basensequenz kommt. Das so neu entstandene Basentriplett codiert für ein Stoppcodon, welches zum Abbruch der Translation und zu einem verkürzten HCN2-Protein führt. In einer vorherigen Studie konnte gezeigt werden, dass diese C-terminalen Trunkationen des HCN2-Kanals in der Lage sind, das VAPB-Protein in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment zu binden (Walecki 2011, siehe Abbildung 3.21). Einige ausgewählte Trunkationen (K209X, R312X, F486X, L530X und V628X) werden jedoch zur Vollständigkeit und zum besseren Verständnis erneut in dieser Arbeit zusammengefasst (Abbildung 3.19). Ungeklärt blieb jedoch, ob diese C-terminalen Trunkationen bei einer Ko-Expression mit dem VAPB-Protein interagieren können und es zu der erwarteten Stromamplitudenvergrößerung (Abbildung 1.8) bei geringen Mengen an VAPB kommt. Daher wurden diese C-terminalen trunkierten HCN2-Kanäle in dieser Arbeit mittels Erfassung der mittleren Amplituden bei -130 mV hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften untersucht.

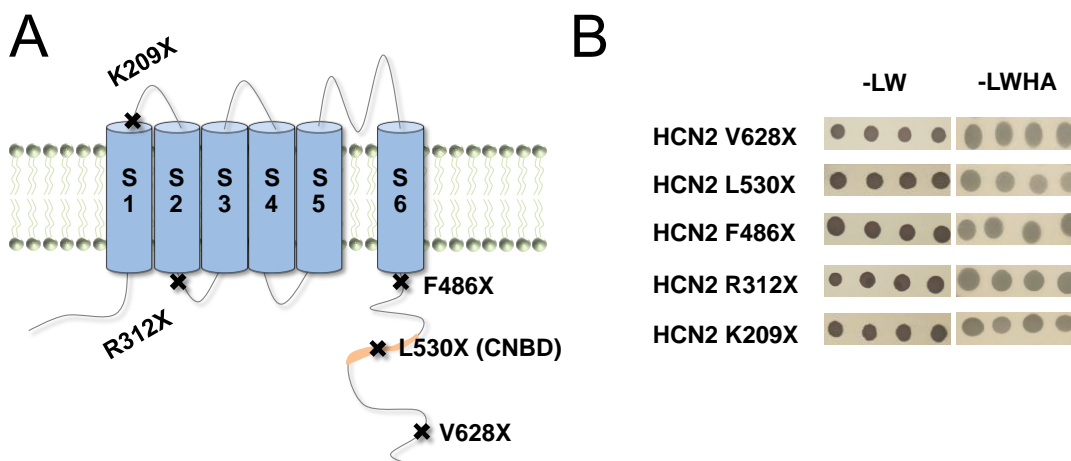


Abbildung 3.19 Hefe-Zwei-Hybrid Experimente lassen eine geringe Relevanz des C-Terminus an der Interaktion zwischen VAPB und dem HCN2-Kanal (mod. nach Walecki 2011)

A Schematische Darstellung zeigt die Mutanten des HCN2-Kanals in Abhängigkeit von ihrer Lage. Es handelt sich hierbei um die Mutanten: K209X, R312X, F486X, L530X (CNBD) und V628X. **B** Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente der entsprechenden Mutationen im HCN2-Kanal. Die C-terminal trunkierten Mutanten des HCN2-Kanals sind weiterhin in der Lage an das VAPB-Protein zu binden.

Die beiden aufgeführten Trunkationen HCN2 K209X und HCN2 R312X wurden aufgrund ihrer fehlenden stromleitenden Porendomäne nicht elektrophysiologisch untersucht. Die restlichen Mutanten (F486X, V638X und L530X) wurden mittels TEVC hinsichtlich einer Modulation durch VAPB analysiert. Eine geringe Konzentration an VAPB (1 ng) erzeugte weiterhin eine Erhöhung der Stromamplitude bei beiden untersuchten Mutanten. Die hohe Konzentration an VAPB (9 ng) führte bei allen C-terminal trunkierten HCN2-Kanälen zur Verringerung der Stromamplitude vergleichbar zu einer Ko-Expression mit einem Wildtyp-HCN2-Kanal.

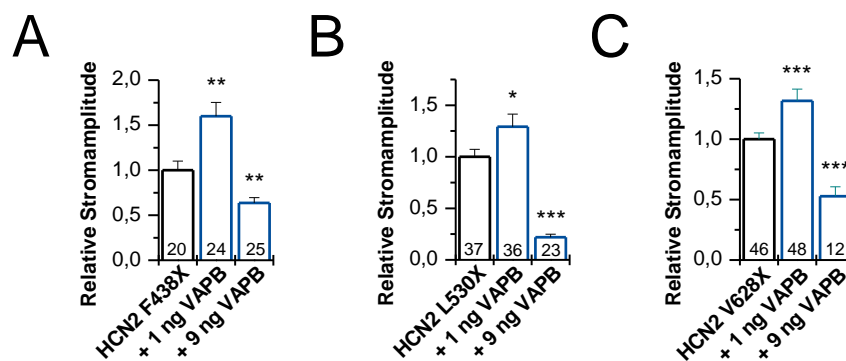


Abbildung 3.20 Auch C-terminale Trunkationsmutanten des HCN2-Kanals werden durch das VAPB-Protein in ihrer Stromamplitude moduliert

Zusammenfassung der TEVC Messungen der C-terminalen Trunkationsmutanten mit ihren jeweiligen Mittelwerten der relativen Stromamplituden und dem Fehler der Standardabweichung. Die Expression der Mutante ist jeweils in schwarz dargestellt, während die Ko-Expressionen mit dem VAPB-Protein in dunkelblau abgebildet sind. **A** Zusammenfassung der Ergebnisse der Trunkationsmutante HCN2 F486X ($1,0 \pm 0,1$; $n=20$) und bei einer Ko-Expression mit 1 ng VAPB ($1,6 \pm 0,2$; $n=24$) und 9 ng VAPB ($0,6 \pm 0,1$; $n=36$). **B** Mutante HCN2 L530X ($1,0 \pm 0,1$; $n=37$) zeigt eine Stromamplitudenvergrößerung bei einer Ko-Expression mit 1 ng VAPB ($1,28 \pm 0,12$; $n=36$) und eine Verkleinerung mit 9 ng VAPB ($0,2 \pm 0,03$; $n=23$). **C** Elektrophysiologische Messungen der Trunkationsmutante HCN2 V628X ($1,0 \pm 0,1$; $n=46$) zeigten eine Stromvergrößerung bei einer Ko-Expression mit 1 ng VAPB ($1,3 \pm 0,1$; $n=48$) und eine Stromreduktion mit 9 ng VAPB ($0,5 \pm 0,1$; $n=12$).

Die Messungen zeigen, dass der C-Terminus des HCN2-Kanals nicht essentiell für eine Interaktion mit dem VAPB-Protein ist. Allerdings kann eine Beteiligung des C-Terminus dennoch nicht ausgeschlossen werden.

3.4.2 Der N-Terminus des HCN2 vermittelt die Interaktion mit dem VAPB-Protein

Bei dem hier verwendeten Konstrukt (HCN2 NTK) handelt es sich um eine N-terminale Trunkation des HCN2-Kanals, welches von Chen *et al.* im Jahr 2000 beschrieben wurde. Chen *et al.* zeigten, dass eine Trunkation des N-Terminus zu elektrophysiologischen Eigenschaften führt, welche vergleichbar zu einem Wildtyp-HCN2-Kanal sind.

Die TEVC Experimente zeigten, dass das Fehlen des N-Terminus des HCN2-Kanals zum Ausbleiben der Modulation durch das VAPB-Protein führt. In Abbildung 3.21A sind Beispielströme des HCN2 und der Ko-Expression mit einer hohen Konzentration des VAPB-Proteins dargestellt. Es zeigte sich, dass weder eine niedrige VAPB Konzentration zu einer Stromerhöhung führt, noch dass eine hohe VAPB-Protein Konzentration die Folge einer Reduktion der Stromamplitude hat (Abbildung 3.21B). Stattdessen blieb die Stromamplitude des HCN2-Stroms konstant.

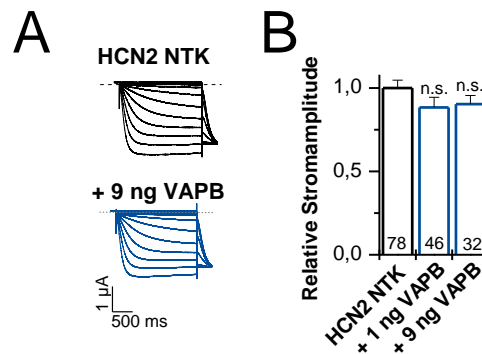


Abbildung 3.21 Der N-terminal trunkierte HCN2-Kanal wird nicht durch VAPB moduliert

A Die Abbildung zeigt Beispielströme für den HCN2 NTK und für die entsprechende Ko-Expression mit 9 ng VAPB. **B** Zusammenfassung der elektrophysiologischen Untersuchung zeigte eine unveränderte Stromamplitude bei einer Ko-Expression des HCN2 NTK mit dem VAPB-Protein. Die Auswertung der Stromamplituden ergab folgende Daten: HCN2 NTK ($1,0 \pm 0,1$; $n=78$) zeigte im Vergleich zu den Ko-Expressionen HCN2 NTK + 1 ng VAPB ($0,9 \pm 0,1$; $n=46$) und + 9 ng VAPB ($0,9 \pm 0,1$; $n=32$) keine signifikanten Veränderungen der Stromamplitude.

Die Daten der elektrophysiologischen Untersuchung zeigen, dass der N-Terminus des HCN2-Kanals essentiell für eine Interaktion mit dem VAPB-Protein und die damit verbundene Modulation der Stromamplitude ist.

3.5 Die über das VAPB vermittelte Stromamplitudenmodulation wird durch eine veränderte Oberflächenexpression des HCN2-Kanals verursacht

3.5.1 Das VAPB-Protein moduliert die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals nach Ko-Expression in *Xenopus laevis* Oozyten

In einer vorherigen Studie wurde postuliert, dass das VAPB-Protein keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals in Oozyten hat (Walecki 2011). In dieser Arbeit konnte diese Hypothese jedoch widerlegt werden. Elektrophysiologische Experimente zeigten, dass das zuvor verwendete Hämagglutinin (HA)-markierte HCN2-Konstrukt nicht in der Lage ist, die Stromamplitude des HCN2-Kanals zu modulieren. Die Daten der vorhergehenden Arbeit konnten nicht bestätigt und verifiziert werden. Entsprechend wurde ein neues Konstrukt mit HA-Markierung kloniert und auf dessen Modulation durch das VAPB-Protein getestet. Die Ergebnisse dieses Interaktionstest sind in Abbildung 3.22A grafisch zusammengefasst und das validierte neue Konstrukt im Oberflächenexpressionstest eingesetzt. Das HA-Epitop des HCN2 wurde mittels Antikörpern (Peroxidase-gekoppelt) unter Substratgabe nachgewiesen (Kapitel 2.1.20). Bei einer Ko-Expression des HCN2-HA Konstrukts mit den verschiedenen VAPB-Protein Konzentrationen konnte nachgewiesen werden, dass dieses durch VAPB in ähnlichem Maße moduliert wird, wie das Wildtyp-HCN2 Konstrukt (siehe Kapitel 1.4.2). Eine niedrige Konzentration des VAPB-Proteins führt zu einer Vergrößerung der Stromamplitude bei -130 mV ($1,6 \pm 0,1$; n=10, dunkelblau), vergleichbar mit der in Kapitel 1.4.2 beschriebenen Modulation des unveränderten HCN2-Kanals. Zudem erhöhte es die Oberflächenexpression des HCN2-HA-Proteins, erkennbar in einer Erhöhung der relativen Lichteinheiten im Vergleich zu den Oozyten die lediglich das HCN2-HA-Protein exprimierten ($1,0 \pm 0,1$; n=44, schwarz) (Abbildung 3.22B). Im Gegensatz dazu wurde die Stromamplitude des HCN2-HA (schwarz) durch die beiden höheren Konzentrationen (dunkelblau) reduziert (Abbildung 3.22A). Proportional dazu haben sich die relativen Lichteinheiten verhalten, die ebenfalls durch das VAPB-Protein in hohen Konzentrationen reduziert wurden (Abbildung 3.22B, dunkelblau).

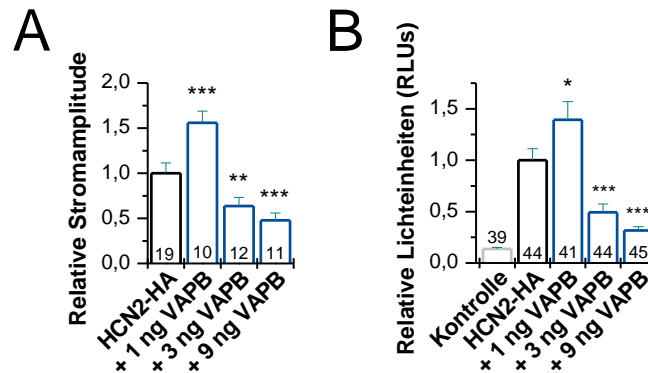


Abbildung 3.22 Das VAPB-Protein moduliert die Stromamplitude und die Oberflächenexpression des HCN2-HA-Kanals

A Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des HCN2-HA Konstrukts wurde der HCN2-HA Kanal (schwarz) mit den unterschiedlichen Konzentrationen an VAPB-Protein (dunkelblau) in Oozyten ko-exprimiert. Die relativen Stromamplituden der Expressionen waren: HCN2-HA: $1,0 \pm 0,1$ (n=19); HCN2-HA + 1 ng VAPB: $1,6 \pm 0,1$ (n=10); HCN2-HA + 3 ng VAPB: $0,6 \pm 0,1$ (n=12) und HCN2-HA + 9 ng VAPB: $0,5 \pm 0,1$ (n=11). **B** Die Oberflächenexpression des HCN2-HA-Kanals wurde durch das VAPB-Protein moduliert. Die Ergebnisse des Oberflächenassays sind nachfolgend zusammengefasst. Als Kontrolle ($0,14 \pm 0,01$, n=39, hellgrau) dienten Oozyten ohne Expression. Die relativen Lichteinheiten des Oberflächenassays betrugen: HCN2-HA: $1,0 \pm 0,1$ (n=44); HCN2-HA + 1 ng VAPB: $1,4 \pm 0,2$ (n=41); HCN2-HA + 3 ng VAPB: $0,5 \pm 0,1$ (n=44) und HCN2-HA + 9 ng VAPB: $0,3 \pm 0,04$ (n=45). Das VAPB-Protein erhöht somit die Oberflächenexpression und Stromamplitude des HCN2-HA in niedriger Konzentration, während höhere Konzentrationen zu einer Stromreduktion und auch Reduktion der Oberflächenexpression führen.

3.5.2 Die Transmembrandomäne des VAPB-Proteins ist in der Lage, die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals in Oozyten zu erhöhen

Eine vorherige Studie zeigte, dass die Transmembrandomäne des VAPB-Proteins bei einer Ko-Expression in der Lage ist, die Stromamplitude des HCN2-Kanals zu erhöhen (Walecki 2011, Kapitel 1.4.2). Ungeklärt hierbei blieb jedoch, auf welchem Mechanismus diese Stromamplitudenerhöhung beruht. In meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Oberflächenexpression des HCN2-Kanals ein wesentlicher Faktor für die elektrophysiologische Modulation des HCN2-Stroms ist. Hierzu wurden neben dem Oberflächenexpressionsassay mittels Chemilumineszenz auch elektrophysiologische Untersuchungen derselben *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt. Hierdurch konnte die Oberflächenexpression in Relation zur Stromamplitude gesetzt werden. Es zeigte sich, dass sich die Stromamplitude des HCN2-HA (Abbildung 3.23A) proportional zur Erhöhung der Oberflächenexpression bei einer Ko-Expression mit VAPB-TM verhält (Abbildung 3.23B).

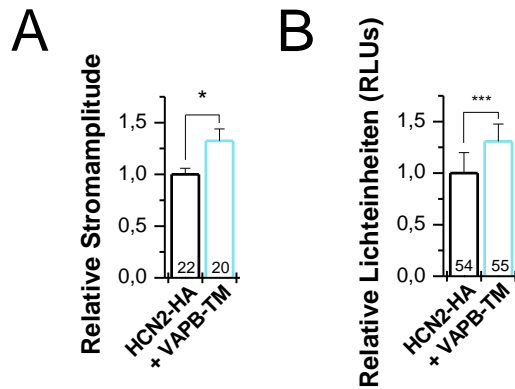


Abbildung 3.23 Die Transmembrandomäne des VAPB-Proteins moduliert die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals

A Darstellung der relativen Stromamplituden des HCN2-HA-Kanals (schwarz) und der Ko-Expression mit der Transmembrandomäne des VAPB-Proteins (VAPB-TM, cyan). Die Auswertung der relativen Stromamplituden ergab folgende Werte: HCN2-HA $1,0 \pm 0,1$ (n=22) und HCN2-HA + VAPB-TM $1,3 \pm 0,1$ (n=20). Die Stromamplitude wurde durch die Ko-Expression von VAPB-TM signifikant erhöht. **B** Ergebnisse des Oberflächenassays, welche gepaart zu den TEVC Messungen vorlagen. Die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals (schwarz) wurde durch die Ko-Expression mit dem VAPB-TM-Protein (cyan) signifikant erhöht. Die Mittelwerte der relativen Lichteinheiten waren: HCN2-HA $1,0 \pm 0,2$ (n=54) und HCN2-HA + VAPB-TM $1,3 \pm 0,2$ (n=55).

3.5.3 Der N-Terminus des HCN2-HA-Kanals ist in Oozyten essentiell für die VAPB-abhängige Modulation der Oberflächenexpression

In den elektrophysiologischen Untersuchungen der N-terminalen Trunkation HCN2-NTK zeigte sich, dass eine Deletion des HCN2-Kanals die modulativen Eigenschaften des VAPB-Proteins auf die Stromamplitude unterbindet (Kapitel 3.4.2). Daher wurden zusätzlich Experimente zur Oberflächenexpression mit einem HCN2-NTK-HA Konstrukt durchgeführt, welches über eine zusätzliche HA-Markierung verfügt und der N-Terminus durch Mutation entfernt wurde. Um sicher zu stellen, dass das Einfügen der HA-Markierung keinen Einfluss auf die Modulation durch das VAPB-Protein hat, wurde das neue HCN2-NTK-HA Konstrukt elektrophysiologisch untersucht. In Abbildung 3.24A sind die Ergebnisse der TEVC Messungen zusammengefasst. Es zeigte sich, dass das HCN2-NTK-HA Protein nicht durch das VAPB-Protein moduliert werden kann. Dies ist vergleichbar mit den Messungen des HCN2-NTK ohne HA-Markierung (Abbildung 3.21). Die Stromamplitude des HCN2-NTK-HA wurde weder durch eine niedrige VAPB Konzentration ($0,9 \pm 0,1$; n=10), noch durch die Ko-Expression mit hohen Konzentrationen ($1,1 \pm 0,1$; n=11) moduliert und liegt somit unverändert vor. Gepaart zu den TEVC Messungen wurden die relativen Lichteinheiten bestimmt, welche während des Oberflächenexpressionstests ermittelt wurden. Sie zeigten, dass die Oberflächenexpression des HCN2-NTK-HA durch die Ko-Expression mit dem VAPB-Protein nicht beeinflusst wird. Als Kontrolle dienten erneut Oozyten

ohne Expression ($0,04 \pm 0,01$; $n= 61$, hellgrau). Die relativen Lichteinheiten des HCN2-NTK-HA waren im Vergleich zu den Ko-Expressionen von VAPB in niedriger Konzentration und hoher Konzentration nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 3.24B).

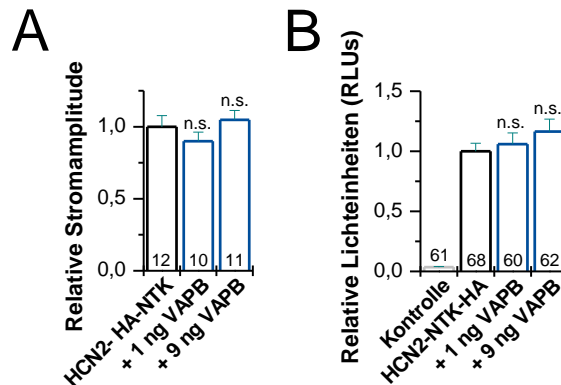


Abbildung 3.24 Die Oberflächenexpression des HCN2-NTK-HA in Oozyten wird nicht durch das VAPB-Protein moduliert

A Elektrophysiologische Untersuchung der Stromeigenschaften des HCN2-NTK-HA. Eine Ko-Expression mit VAPB ($0,9 \pm 0,1$; $n= 10$) und HCN2-NTK-HA + 9 ng VAPB ($1,1 \pm 0,1$; $n= 11$) hat keinen Einfluss auf die Stromamplitude des HCN2-NTK-HA ($1,0 \pm 0,1$; $n=12$). **B** Oberflächenassay des HCN2-NTK-HA Konstrukts ($1,0 \pm 0,1$; $n=68$) ko-exprimiert mit VAPB. Die weiteren gemessenen relativen Lichteinheiten waren: Kontrolle ($0,04 \pm 0,01$; $n= 61$); HCN2-NTK-HA + 1 ng VAPB ($1,1 \pm 0,1$; $n= 60$) und HCN2-NTK-HA + 9 ng VAPB ($1,2 \pm 0,1$; $n= 62$).

3.5.4 VAPB und VAPB-TM modulieren die Oberflächenexpression in HeLa-Zellen

Zur Bestätigung der Messdaten zur Oberflächenexpression in Oozyten wurden zusätzlich Oberflächenassays in HeLa-Zellen durchgeführt. Hierzu wurde ein N-terminal GFP-markiertes HCN2-Konstrukt verwendet, das zusätzlich noch über ein extrazelluläres HA-Epitop verfügt (HCN2 eGFP-HA). Hierdurch konnte neben einem „Imaging“ der Zellen auch eine Bestimmung der Oberflächenexpression an fixierten und nicht permeabilisierten Zellen durchgeführt werden. Für die Bestimmung der Oberflächenexpression und dem „Imaging“ wurden HCN2 eGFP-HA ($1 \mu\text{g}$) und VAPB pcDNA3.1 ($1 \mu\text{g}$) oder VAPB-TM pcDNA3.1 ($1 \mu\text{g}$) zu gleichen Teilen ko-transfiziert. Um eine gleichbleibende Gesamt-DNA Menge ($2 \mu\text{g}$) zu gewährleisten, wurden die Zellen mit dem Leervektor pcDNA3.1 ($1 \mu\text{g}$) im Falle der HCN2 eGFP-HA Experimente transfiziert. Bis zur Durchführung der Experimente verblieben die Zellen für 48 Stunden im Inkubator. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen durch welche die Hintergrund-Lumineszenz festgestellt werden konnte. Eine Ko-Transfektion von VAPB mit HCN2 eGFP-HA führt zu einer circa 1,5-fachen Erhöhung der Oberflächenexpression des HCN2 eGFP-HA (Abbildung 3.25A, unten). Um

auszuschließen, ob es sich hierbei um einen Nebeneffekt einer veränderten Proteintranslation handelt, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die Lysate mittels Bradfordassay auf dieselbe Proteinkonzentration eingestellt, anschließend mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Es zeigte sich, dass die erhöhte Oberflächenexpression, die durch die Ko-Transfektion mit dem VAPB-Protein zu beobachten ist, nicht auf einer veränderten Proteintranslation zurückzuführen ist. Die Banden des Western Blot weisen die gleiche Intensität auf mit und ohne Ko-Transfektion von VAPB (Abbildung 3.25A, oben). Gleichermaßen wurde auch verfahren mit VAPB-TM. Eine Ko-Transfektion zeigte auch in diesem Fall keine veränderte Proteintranslationseffizienz (Abbildung 3.25B, oben). Die Transmembrandomäne des VAPB-Proteins war ebenfalls in der Lage, die Oberflächenexpression des HCN2 eGFP-HA Proteins zu erhöhen. Die relativen Lichteinheiten der Transfektion von HCN2 eGFP-HA ($1,0 \pm 0,1$; $n=6$) unterschieden sich signifikant von denen der Ko-Transfektion mit VAPB-TM ($1,6 \pm 0,1$; $n=6$) (Abbildung 3.25B, unten).

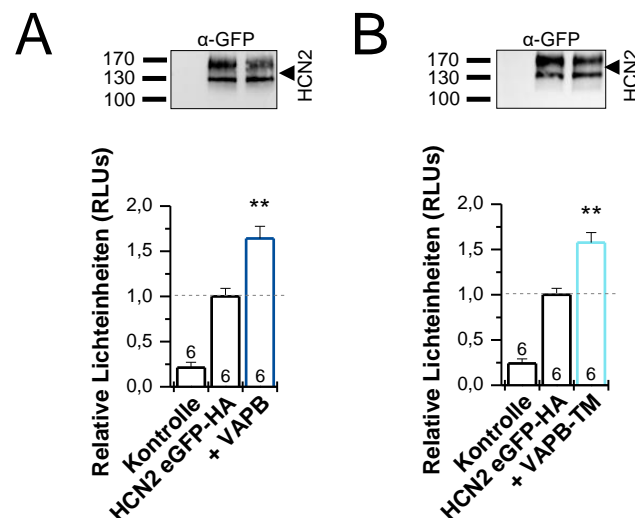


Abbildung 3.25 Die Oberflächenexpression von HCN2 eGFP-HA (N-terminal) wird durch VAPB und VAPB-TM signifikant erhöht

A Darstellung fasst die Ergebnisse des Western Blots und der Bestimmung der relativen Lichteinheiten für VAPB zusammen. Als Kontrolle ($0,2 \pm 0,1$; $n=6$, schwarz) dienen nicht transfizierte HeLa-Zellen. Die Oberflächenexpression nimmt bei der Ko-Transfektion von VAPB ($1,6 \pm 0,1$; $n=6$, dunkelblau) im Vergleich zur Transfektion mit HCN2 eGFP-HA ($1,0 \pm 0,1$; $n=6$, schwarz) zu. Die Translationseffizienz des HCN2-Proteins bleibt hierbei jedoch unbeeinflusst. Die Intensitäten der Banden im Western Blot sind nicht signifikant unterschiedlich. **B** Wiederholung des Versuchs mit VAPB-TM führte ebenfalls zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression im Vergleich zur Transfektion lediglich mit HCN2 eGFP-HA. Es ergaben sich folgende relative Lichteinheiten: Kontrolle (schwarz) $0,2 \pm 0,1$ ($n=6$); HCN2 eGFP-HA (schwarz) $1,0 \pm 0,1$ ($n=6$) und HCN2 eGFP-HA + VAPB-TM (türkis) $1,6 \pm 0,1$ ($n=6$). Unverändert blieb auch in diesem Fall die Translationseffizienz.

Neben der luminometrischen Bestimmung der Oberflächenexpression wurde zusätzlich ein „Imaging“ der transfizierten Zellen durchgeführt. Bei gleicher Belichtungszeit (300 ms) konnte beobachtet werden, dass die Oberflächenexpression bei einer Ko-Transfektion mit VAPB oder VAPB-TM zu einer Erhöhung der Fluoreszenz führt (Abbildung 3.26). Die Zellen verfügen über eine verstärkte Oberflächenexpression und eine scheinbar höhere Gesamtfluoreszenz. Hierbei ist es unabhängig, ob die Transfektion 24 Stunden oder 48 Stunden zurückliegt. Dies ist mit den Ergebnissen des luminometrischen Oberflächenassays in HeLa-Zellen (Abbildung 3.25) und Oozyten (Abbildung 3.22) vereinbar und stützt die Hypothese, dass es zu einer erhöhten Oberflächenexpression bei einer Ko-Transfektion mit VAPB kommt.

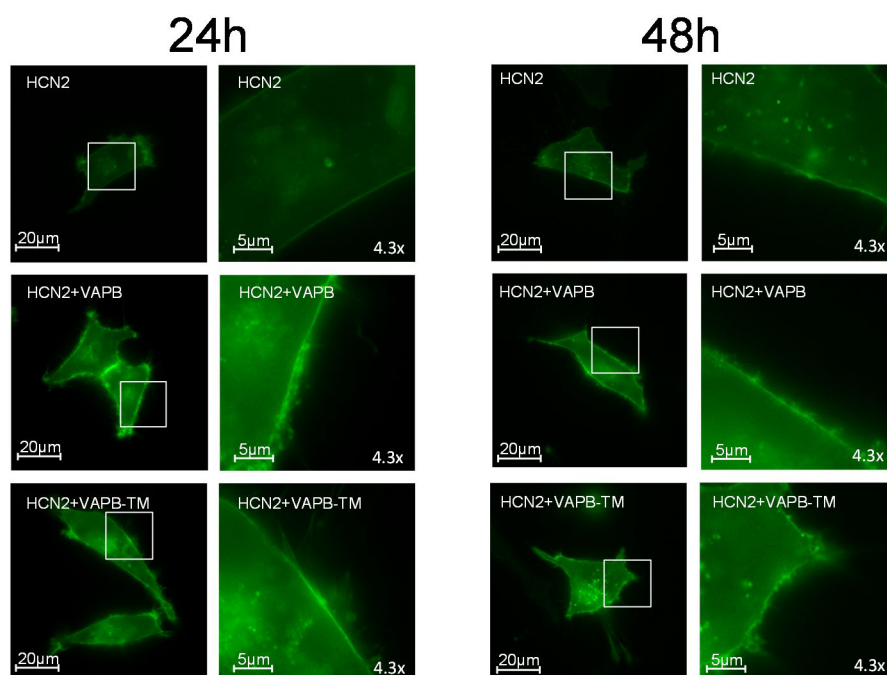


Abbildung 3.26 Imaging der HeLa-Zellen aus dem Oberflächenassays bestätigen die Ergebnisse aus den luminometrischen Experimenten

Live-Cell Imaging der transfizierten HeLa-Zellen bei einer Belichtungsdauer von jeweils 300 ms nach 24 (links) und 48 Stunden (rechts). **A** HCN2 eGFP HA + pcDNA3.1 wiesen eine verringerte Fluoreszenzstärke und Oberflächenexpression im Vergleich zur Ko-Transfektion mit VAPB (**B**) und VAPB-TM (**C**) auf. **B** Ko-Transfektion mit VAPB zeigte eine verstärkte Fluoreszenz bei gleicher Belichtung im Vergleich zur Expression des HCN2-Kanals alleine. **C** Ko-Transfektion mit VAPB-TM zeichnete sich durch eine deutliche Anfärbung der Membran und erhöhte Fluoreszenz aus.

3.6 Das VAPB-Protein hat Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der spontanaktiven Herzmuskelzelllinie HL-1

HL-1 Zellen sind spontanaktiv und daher in der Lage, ohne äußeren Stimulus rhythmisch zu kontrahieren. Zusätzlich exprimieren HL-1 Zellen endogene I_f -Ströme, die mittels der Patch-Clamp Technik in der „Whole-cell“ Konfiguration gemessen werden können. PCR-Expressionsanalysen haben ergeben, dass alle vier HCN-Untereinheiten in HL-1 Zellen vorkommen, jedoch HCN1 und HCN2 die dominanten Untereinheiten sind (Sartiani et al. 2002). Daher eigneten sich die HL-1 Zellen hervorragend zur Untersuchung der möglichen physiologischen Relevanz des VAPB-Proteins auf den HCN-Kanal. In den HL-1 Zellen wurden elektrophysiologische Messungen mittels der Patch-Clamp Technik der in „Whole-Cell“ Konfiguration durchgeführt. Neben der Messung von Strömen wurden zusätzlich Aktionspotentiale der spontan aktiven Zellen aufgenommen. Zum einen sollte das Verhalten der Zellen während einer Überexpression des VAPB-Proteins durch Transfektion festgestellt werden. Zum anderen sollten unter „Knock-Down“-Bedingungen, mittels shRNA, determiniert werden, welche Modulationen des HCN-Stroms stattfinden.

3.6.1 Western Blot Analyse der Lysate des VAPB-„Knock-Downs“ via shRNA

Der Nachweis des erfolgreichen VAPB-„Knock-Downs“ erfolgte mittels Western Blot und Antikörperfärbung mit α -VAPB. Hierzu wurden die HL-1 Zellen zunächst transfiziert und anschließend mittels Puromycin behandelt. Durch die Behandlung mit Puromycin sterben diejenigen Zellen ab, die das shVAPB Plasmid nicht aufgenommen haben. Somit werden lediglich die transfizierten Zellen zur Herstellung eines Proteinlysates verwendet. In den HL-1 Zellen, die mit der Kontroll-shRNA transfiziert wurden, konnte das VAPB-Protein als deutliche Bande im Western Blot nachgewiesen werden. Wohingegen bei der Transfektion mit shVAPB kein Protein mehr nachweisbar war (Abbildung 3.27). Der Western Blot wurde wie in Kapitel 2.1.17 beschrieben durchgeführt.

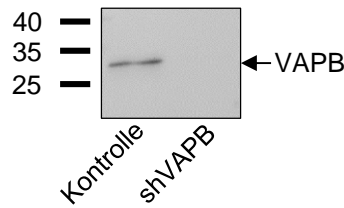


Abbildung 3.27 Nachweis des shRNA „Knock-Downs“

Mittels α -VAPB Färbung im Western Blot konnte nachgewiesen werden, dass der shRNA „Knock-Down“ zu einer fehlenden VAPB-Protein Translation führt. In der Transfektion mit der Kontroll-shRNA konnte weiterhin das VAPB-Protein nachgewiesen werden.

3.6.2 Das VAPB-Protein reguliert die Schlagfrequenz von HL-1 Zellen

Zunächst wurde die Schlagfrequenz der HL-1 Zellen durch visuelles Zählen der Schläge pro Minute bestimmt. Hierzu wurden mehrere Zählungen durchgeführt und der Mittelwert bestimmt. Die Zellen wiesen dabei eine gleichmäßige Kontraktionsfrequenz auf. Da nicht alle Zellen in der Lage sind sich zu kontrahieren, wurden einzelne Bereiche in den ausgesäten Schälchen beobachtet. Transfiziert wurden die Zellen entweder mit VAPB (Überexpressionsmodell) oder mit shVAPB („Knock-Down“) 24 Stunden nach dem Aussäen (100% Konfluenz) und nach weiteren 24 Stunden ausgezählt.

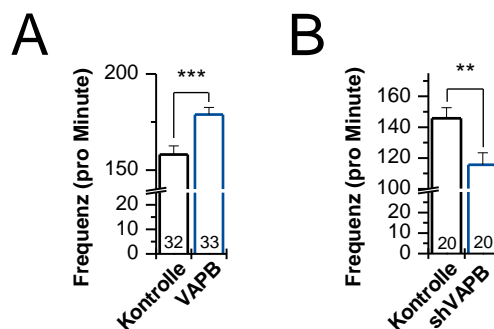


Abbildung 3.28 Die Schlagfrequenz der HL-1 Zellen ist abhängig von der VAPB-Expression

A Zur Bestimmung der Schlagfrequenz wurden HL-1 Zellen mit VAPB-pCDNA3.1(+) und eGFP transfiziert. Ihre Schlagfrequenz lag mit $178,8 \pm 3,7$ Schlägen pro Minute ($n=33$) signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe (transfiziert mit eGFP Plasmid und dem leeren pcDNA3.1 Plasmid, $158,1 \pm 4,4$ Schläge pro Minute; $n=32$). **B** Das Auszählen der Frequenz ergab bei einer Transfektion mit shVAPB ($115,6 \pm 7,8$ Schläge pro Minute; $n=20$) eine Erniedrigung der Schlagfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit einer wirkungslosen shRNA transfiziert wurde ($145,8 \pm 6,9$ Schläge pro Minute; $n=20$).

3.6.3 Das VAPB-Protein führt zu Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften des I_f -Stroms in HL-1 Zellen

Um einen direkten Einfluss des VAPB-Proteins auf den endogenen I_f der HL-1 Zellen zu untersuchen, wurden elektrophysiologische Experimente unter Überexpression von VAPB oder dessen „Knock-Down“ via shRNA durchgeführt. Da aufgrund der elektrischen Kopplung der HL-1 Zellen keine akkuraten „Whole-Cell“ Messungen durchgeführt werden können, lagen die Zellen mittels Tyropsinverdau dissoziiert vor. Hierzu wurden die HL-1 Zellen auf ein Haltepotential von -30 mV für 100 ms geklemmt, um anschließend einen Testpuls von jeweils 1,5 Sekunden bei verschiedenen Potentialen anzulegen. Hierzu wurde das Potential in 20 mV Schritten von -20 mV auf -120 mV erniedrigt, um anschließend zur Erfassung der „Tail-Currents“ eine Spannung von -110 mV für 300 ms anzulegen (Abbildung 3.29A). Da HL-1 Zellen neben den HCN-Untereinheiten eine Vielzahl weiterer Ionenkanäle exprimieren, musste ausgeschlossen werden, dass diese die Messungen beeinflussen. Hierzu wurde der Intrazellulärlösung die Substanz TEA und der Badlösung wurden Nickelchlorid, Bariumchlorid und 4-Aminopyridin zugesetzt.

Zunächst wurde die Überexpression des VAPB-Proteins in HL-1 Zellen untersucht. Hierfür wurde ein unmarkiertes VAPB-Protein (1,2 µg) transfiziert. Die Kontrollzellen wurden mit dem Leervektor transfiziert, um die gleichen Bedingungen zu schaffen. Da durch die fehlende Markierung des VAPB-Proteins eine erfolgreiche Transfektion nicht erkennbar war, wurden die Zellen zusätzlich mit einem leeren eGFP-Plasmid ko-transfiziert (Verhältnis eGFP:VAPB – 1:4). Dies gewährleistete, dass lediglich transfizierte Zellen (grüne Fluoreszenz) gemessen wurden und in die Auswertung eingingen.

HL-1 Zellen haben keine homogene HCN-Kanal Expression, lediglich 30% der Zellen weisen einen HCN-Strom auf (Sartiani et al. 2002). „Whole-Cell“ Messungen ergaben für die Kontrollmessungen vergleichbare Ergebnisse von circa 38% an Zellen, die einen I_f -Strom haben. Auffallend war, dass eine Überexpression von VAPB zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit führt, dass eine HL-1 Zelle über einen I_f -Strom verfügt (58%) (Abbildung 3.29B).

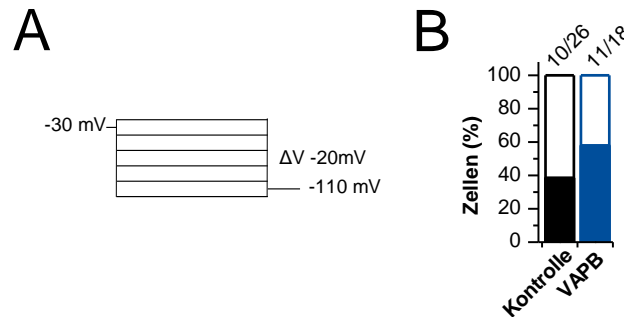


Abbildung 3.29 Das VAPB-Protein erhöht die Wahrscheinlichkeit für einen I_f -Strom in HL-1 Zellen

A Grafische Darstellung des Spannungsprotokolls zur Erfassung der I_f -Stöme in HL-1 Zellen ist definiert durch ein Haltepotential von -30 mV, welches für 100 ms gehalten wird. Anschließend wurde das Potential in 20 mV Schritten von -20 mV auf -120 mV erniedrigt, gefolgt von einem Testpuls bei -110 mV zu Erfassung der „Tail-Currents“. **B** Aufgrund der inhomogenen Expression von HCN-Kanal Proteinen haben lediglich 38% der gemessenen Kontrollzellen (schwarz) einen HCN-Strom. Bei einer Überexpression von VAPB (dunkelblau) steigt die Wahrscheinlichkeit auf 58% der Gesamtzellen.

In Abbildung 3.30A sind Beispielströme der Messungen in HL-1 Zellen abgebildet. Bei diesen Beispielströmen handelt es sich um die Gesamtheit aller gemessenen Ströme normiert auf die jeweilige Zellgröße, sodass sie den Mittelwert des Stromverlaufs darstellen. Betrachtet man diese Beispielströme so fällt auf, dass sowohl die Stromamplitude (Stromverlauf bei -100 mV rot markiert), die Spannungsabhängigkeit, als auch die Kinetik verändert sind. In Abbildung 3.30B sind die durchschnittlichen absoluten Stromamplituden aller Zellen (in pA) bei einem Potential von -100 mV (nach 1,6 Sekunden) dargestellt. Dies bezieht auch die Zellen mit ein, die keinen HCN-Strom zeigten. Auffällig hierbei ist die Tendenz zu einer größeren Stromamplitude durch die Überexpression des VAPB-Proteins im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 3.30B). Diese Tendenz zeigt sich auch innerhalb der Gruppe von Zellen, die einen HCN-Strom aufwiesen. Eine Zelle wurde als I_f -haltig bezeichnet, wenn eine I_f -ähnliche Kinetik zu beobachten war. Die Zellen verfügten unter Kontrollbedingungen über eine durchschnittliche Stromamplitude von $79,7 \pm 10,0$ pA ($n=10$) (Abbildung 3.30B). Eine Transfektion mit dem VAPB-Protein führt zu einer tendenziell erhöhten Stromamplitude (Abbildung 3.30B). Normiert man die Stromgröße auf die Zellgröße erhält man ein ähnliches Bild (Abbildung 3.30C), sodass die Zellgröße als Ursache für die Stromamplitudenvergrößerung ausgeschlossen werden kann. Bei der Betrachtung der Beispielströme in Abbildung 3.30A fällt insbesondere die veränderte Aktivierungskinetik des I_f -Stromes bei einer Transfektion mit VAPB auf. Zur Ermittlung der Zeitkonstanten τ wurden monoexponentielle Ausgleichsgeraden angewendet. Die mittlere Zeitkonstante τ lag im Falle der Überexpression von VAPB signifikant beschleunigt vor (Abbildung 3.30D). Diese Beschleunigung war unabhängig von der Spannung. Die Auswertung der Spannungsabhängigkeit mittels Boltzmann-Funktion ergab, dass eine

Überexpression von VAPB im Vergleich zur Kontrollmessung zu einer Verschiebung der Spannungsabhängigkeit von circa +10 mV zu positiveren Potentialen führt (Abbildung 3.30E). Hierzu wurde für jede Spannung der Spitzenstrom der „Tail-Currents“ auf das jeweilige zelleigene Maximum des „Tail-Currents“ normiert. Die Strom-Spannungskurve wurde anschließend mit der Boltzmann-Funktion gefittet (Abbildung 3.30F).

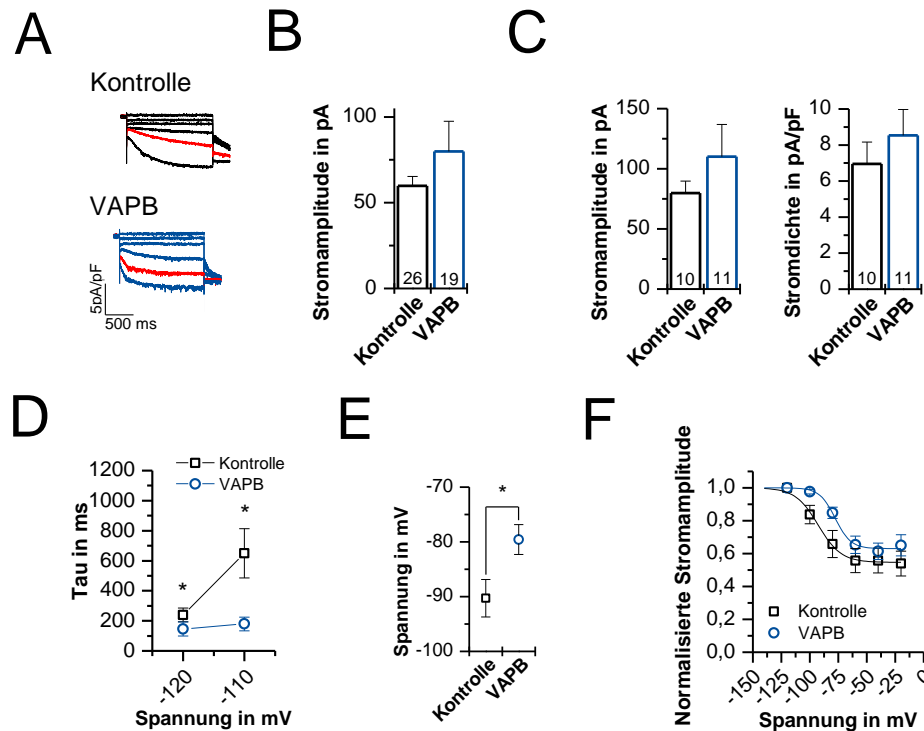


Abbildung 3.30 Eine Transfektion des VAPB-Protein führt in HL-1 Zellen zu einer Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des I_f -Stroms

A Zur Darstellung der Beispielströme der Kontrolle (schwarz) und der Ko-Transfektion mit VAPB (dunkelblau) wurde jeder der gemessenen HCN-Ströme auf die jeweilige Zellgröße normiert und anschließend der Mittelwert gebildet. Zur Verdeutlichung des Effekts auf die Stromamplitude wurde der Messverlauf bei -100 mV in rot markiert. **B** Die Abbildung umfasst die Mittelwerte der Stromamplituden aller gemessenen Zellen (I_f -haltige und I_f -nicht-haltige Messungen) mit VAPB (dunkelblau, $79,9 \pm 17,6$ pA; $n=26$) und ohne VAPB (schwarz, $59,8 \pm 5,5$ pA; $n=19$). **C** Um die HCN-abhängige Stromamplitude zu bestimmen, wurden lediglich die Stromamplituden der Zellen verglichen, die einen I_f -Strom zeigten. Es konnte beobachtet werden, dass es ebenfalls zu einem Anstieg der Stromamplitude durch die Überexpression des VAPB-Proteins (dunkelblau, $110,1 \pm 26,7$ pA; $n=11$) im Vergleich zur Kontrolle (schwarz, $79,7 \pm 10,0$ pA; $n=10$) kommt. Auch bei einer Normalisierung auf die Zellgröße bleibt dieser Effekt erhalten (Kontrolle: $6,96 \pm 1,21$ pA/pF; $n=10$ (schwarz) und Ko-Expression mit VAPB: $8,5 \pm 1,4$ pA/pF; $n=11$ (dunkelblau)). **D** Die Geschwindigkeit der Aktivierung (Zeitkonstante τ) des Kanals ist verändert. Die Überexpression mit VAPB ($179,3 \text{ ms} \pm 46,1 \text{ ms}$; $n=9$) führt beim Potential von -110 mV zu einer signifikanten Beschleunigung im Vergleich zur Kontrollgruppe ($649,0 \text{ ms} \pm 163,5 \text{ ms}$; $n=9$). Bei -120 mV zeigt sich eine verlangsamte Kinetik der Kontrollgruppe ($239,0 \text{ ms} \pm 45,7 \text{ ms}$; $n=10$) im Vergleich zu den Zellen die mit VAPB transfiziert wurden ($111,0 \text{ ms} \pm 32,4 \text{ ms}$; $n=9$). **E** Durch die Überexpression von VAPB ($-79,6 \text{ mV} \pm 2,7 \text{ mV}$; $n=11$) kommt es zu einer Verschiebung der $V_{1/2}$ von circa +10 mV zu positiveren Potentialen (Kontrolle: $-90,3 \text{ mV} \pm 3,4 \text{ mV}$; $n=10$).

Die Überexpression des VAPB-Proteins führt somit insbesondere zu einer Beschleunigung der Aktivierungskinetik und einer Verschiebung der $V_{1/2}$ zu positiven Potentialen, sodass der Kanal bei einer geringeren Hyperpolarisation vermehrt öffnet.

3.6.4 Ein shVAPB „Knock-Down“ von VAPB in HL-1 Zellen führt zu einer Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des I_f - Stroms

Neben der Analyse während einer Überexpression des VAPB wurden auch „Whole-Cell“ Messungen einzelner Zellen unter „Knock-Down“-Bedingungen mittels der Transfektion mit shVAPB durchgeführt. Diese Messungen wurden im „Voltage-Clamp“-Modus des Verstärkers durchgeführt, sodass der Stromverlauf über die Zeit gemessen wurde. Für diese Messungen war es erneut notwendig, die sonstig exprimierten Ionenkanäle der HL-1 Zellen zu blockieren (Kapitel 2.3.2). Zudem wurden die Zellen erneut vereinzelt, um die elektrische Kopplung zu umgehen. Es wurden dieselben Parameter wie in Kapitel 3.6.3 analysiert unter der Verwendung des gleichen Messprotokolls.

In Abbildung 3.31A sind Beispielströme abgebildet, die den Mittelwert aller Messungen repräsentieren. Hierzu wurden die jeweiligen Messungen auf ihre Zellgröße normiert und anschließend der Mittelwert gebildet. Der Strom der Kontrollzellen (schwarz) unterscheidet sich in wesentlichen Merkmalen vom Strom der mit shVAPB transfizierten Zellen (dunkelblau). Zur Verdeutlichung des Effekts auf die Stromamplitude wurde die Messung bei einem Potential von -100 mV in beiden Fällen rot markiert (Abbildung 3.31A). Bei Betrachtung der Stromamplitude normiert auf die jeweilige Zellgröße aller gemessenen Zellen (I_f -haltig und nicht I_f -haltig) fällt auf, dass eine Tendenz zu einer kleineren Stromamplitude vorliegt (Abbildung 3.31B). Die Stromamplitude der Kontrollzellen lag höher als die von shVAPB. Neben den Veränderungen in der Stromamplitude konnte eine signifikante Veränderung der Aktivierung beobachtet werden. Die Transfektion mit shVAPB führte zu einer Verschiebung der Aktivierung zu negativeren Potentialen um circa -8 mV ($-96,2 \pm 2,3$ mV; $n=5$) während die Kontrollzellen eine $V_{1/2}$ von $-88,1 \pm 3,1$ mV ($n=6$) hatten (Abbildung 3.31C). Insbesondere zeigte sich auch bei der Aktivierungskinetik ein inverses Bild. Im Vergleich zur Überexpression des VAPB-Proteins (Kapitel 3.6.3, Beschleunigung der Zeit der Aktivierung) wurde die Zeitkonstante τ der shVAPB transfizierten Zellen deutlich langsamer als die der Kontrollzellen. Diese Modulation war ebenfalls nicht abhängig von der untersuchten Spannung.

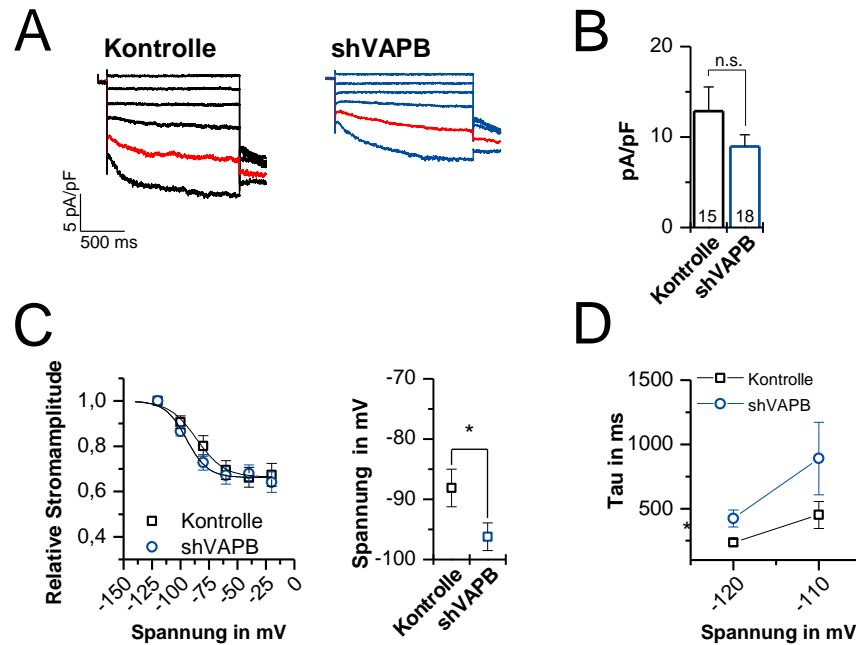


Abbildung 3.31 Stromanalyse des I_f -Stroms während des shRNA „Knock-Downs“

A Die Beispielströme aller Messungen sind normiert auf die jeweilige Zellgröße - Kontrolle (schwarz, n=6) und shVAPB (dunkelblau, n=5). In rot markiert sind die Stromverläufe bei einer Spannung von -100 mV. **B** Die Stromamplitude der Gesamtheit aller Zellen I_f -haltig und I_f -nicht haltige Zellen wurde auf ihre Zellgröße normiert (Kontrolle: $12,9 \pm 2,7$ pA/pF; n=15; shVAPB $9,0 \pm 1,3$ pA/pF; n=18) zeigen eine Tendenz für eine kleinere Stromamplitude. **C** Die $V_{1/2}$ Analyse der Kontrollzellen und der shRNA exprimierenden Zellen zeigte eine Verschiebung von ca. -8 mV zu negativeren Potentialen. **D** Die Untersuchung der Aktivierungskinetik zeigte eine Verlangsamung der Zeitkonstanten τ durch einen „Knock-Down“ mit shVAPB. Die Auswertung ergab bei -120mV: Kontrolle $237,5 \pm 23,7$ ms; shVAPB $423,3 \pm 66,5$ ms; und bei -100 mV: Kontrolle $451,09 \pm 105,05$ ms und shVAPB $890,0 \pm 281,7$ ms.

3.6.5 Ein „Knock-Down“ des VAPB-Proteins führt zu einer Reduktion der Aktionspotentialfrequenz

Der „Knock-Down“ mittels shRNA ergab, wie in Abbildung 3.28 dargestellt, eine Verringerung der Schlagfrequenz in HL-1 Zellen und damit ein inverses Bild der Überexpression von VAPB. Zusätzlich zu den „Whole-Cell“ Messungen im „Voltage-Clamp“, wurden im Falle des shRNA „Knock-Downs“ auch Aktionspotentiale im „Current-Clamp“ gemessen. In diesem Fall wird nicht die Stromstärke aufgezeichnet, sondern der Potentialverlauf über die Zeit. Da es sich um eine spontanaktive Zelllinie handelt, war eine Strominjektion mittels des Verstärkers zum Auslösen von Aktionspotentialen nicht notwendig und es wurde bei 0 mA gemessen. Hierzu mussten sich die Zellen im Zellverband befinden, sodass eine elektrische Kopplung und somit Kontraktion möglich war. Für die unterschiedlichen Messabläufe wurden entsprechend verschiedene Lösungen verwendet, die im Kapitel 2.1 beschrieben sind. Bei der Transfektion mit der shRNA war kein zusätzlicher Marker zur Identifikation der transfizierten Zellen notwendig. Die verwendeten Plasmide (shVAPB und

Kontroll-shRNA) codieren zusätzlich für das GFP-Protein, sodass eine grüne Fluoreszenz bei einer erfolgreichen Transfektion zu beobachten war. Repräsentative Beispielströme sind in Abbildung 3.32A dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die veränderte Frequenz der Aktionspotentiale zwischen den Kontrollzellen (schwarz) und den mit shVAPB transfizierten Zellen (dunkelblau).

Die Analyse der Aktionspotentialfrequenz bestätigte die zuvor ermittelte Reduktion der Schlagfrequenz des VAPB „Knock-Downs“ (Abbildung 3.32B und Abbildung 3.28B). Die Kontrolle mit einer Frequenz von $78,0 \pm 3,0$ Schläge pro Minute ($n=6$) war signifikant schneller als die shRNA transfizierten Zellen mit $62,2 \pm 4,4$ Schläge pro Minute ($n=5$) (Abbildung 3.32B).

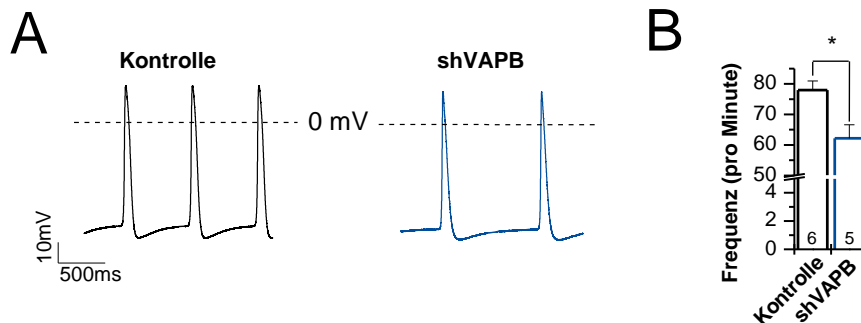


Abbildung 3.32 Die Transfektion mit shVAPB führt zu einer Reduktion der Aktionspotentialfrequenz bei Patch-Clamp Messungen

A Die Beispielmessungen der Kontrolle (schwarz) und des „Knock-Downs“ mittels shVAPB (dunkelblau) zeigen deutliche Frequenzunterschiede bei einer ähnlichen Form. **B** Die Auswertung der Anzahl der Aktionspotentiale während der Patch-Clamp Messungen ergab eine verringerte Schlagrate pro Minute im Fall der Transfektion mit shVAPB ($62,2 \pm 4,4$ Schläge pro Minute; $n=5$) im Vergleich zur Kontrolle ($78,0 \pm 3,0$ Schläge pro Minute; $n=6$).

Ein Aktionspotential kann anhand verschiedener Parameter analysiert werden. Wesentliche Merkmale sind zum Beispiel die APD_{50} und APD_{90} . Sie spiegeln die Breite des Aktionspotentials bei 50 und 90 Prozent der Gesamthöhe des Aktionspotentials wider. Zusätzlich wird häufig das maximale diastolische Potential (MDP) als Größe angegeben. Dies ist der Ausgangspunkt von dem die Dauer der diastolischen Depolarisation gemessen wird. Diese dauert bis zum Erreichen des Schwellenwerts und damit dem Aufstrich des neuen Aktionspotentials (DiFrancesco 2010). Die Dauer der diastolischen Depolarisation wird vor allem durch den I_f -Strom beeinflusst (Fenske et al. 2011). Eine schematische Darstellung der analysierten Parameter ist in Abbildung 3.33 abgebildet. Bei Betrachtung der Beispielaktionspotentiale der gemessenen Zellen fällt eine ausgeprägte diastolische Depolarisation auf. Sartiani *et al.* (2002) beschrieben, dass bei HL-1 Zellen diese auch nur geringfügig ausfallen kann, wenn eine verringerte oder fehlende HCN-Kanal Expression vorliegt.

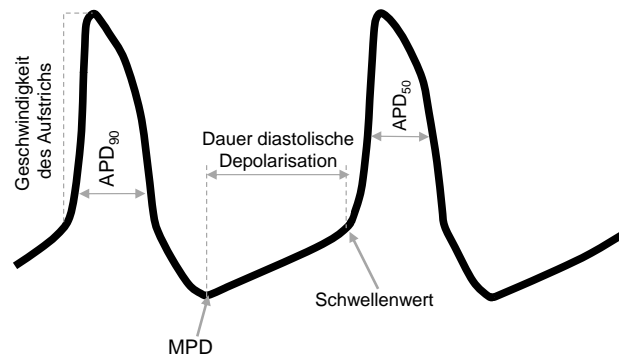


Abbildung 3.33 Schematische Darstellung der analysierten Aktionspotential-Parameter

Schematische Darstellung zweier aufeinanderfolgender Aktionspotentiale bei der folgende Parameter bestimmt wurden: Dauer der diastolischen Depolarisation (in ms); Schwellenwert des Aktionspotentials (in mV); MDP – maximales diastolisches Potential (in mV); sowie die APD₅₀ und APD₉₀, die die Aktionspotentialdauer bei 50% bzw. 90% der Gesamtamplitude angeben (in ms); Geschwindigkeit des Aufstrichs (in mV/ms), welche ausgehend vom Schwellenwert bis zum Peak des Aktionspotentials bestimmt wurde.

Durch eine Veränderung der Eigenschaften des I_f -Stroms können verschiedene dieser Parameter beeinflusst werden. Entsprechend wurde der Schwellenwert des Aktionspotentials bestimmt, der jedoch im Falle des „Knock-Downs“ unverändert vorliegt, im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 3.34A). Die Aktionspotentialdauer wurde mittels der Parameter APD₅₀ und APD₉₀ bestimmt. Im Falle der Transfektion mit shVAPB waren beide Zeiten signifikant verlängert (Abbildung 3.34B). Die Dauer der APD₅₀ verlängerte sich von $87,5 \pm 3,3\text{ms}$ ($n=6$) um circa 30 ms auf $101,8 \pm 3,8\text{ ms}$ ($n=5$). Gleiches galt für die APD₉₀ mit einer Dauer von $145,6 \pm 5,8\text{ ms}$ ($n=6$) für die Kontrollzellen, während die Transfektion mit shVAPB zu einer Verlängerung der Dauer auf $180,1 \pm 6,6\text{ ms}$ ($n=5$) führte. Ebenfalls verlängert war die Dauer der maximalen diastolischen Depolarisation von $511,6 \pm 9,5\text{ms}$ ($n=6$) der Kontrollzellen auf $652,2 \pm 29,6\text{ ms}$ bei den Zellen die mit shVAPB transfiziert wurden ($n=5$) (Abbildung 3.34C). Zusätzlich wurde die Geschwindigkeit des Aufstrichs des Aktionspotentials analysiert. Die Auswertung ergab jedoch, dass diese unverändert im Vergleich zu den Kontrollzellen vorlag (Abbildung 3.34D). In der Abbildung 3.34E ist das maximale diastolische Potential (MDP) dargestellt, das ebenfalls im Vergleich zu den Kontrollzellen keine signifikanten Veränderungen aufweist.

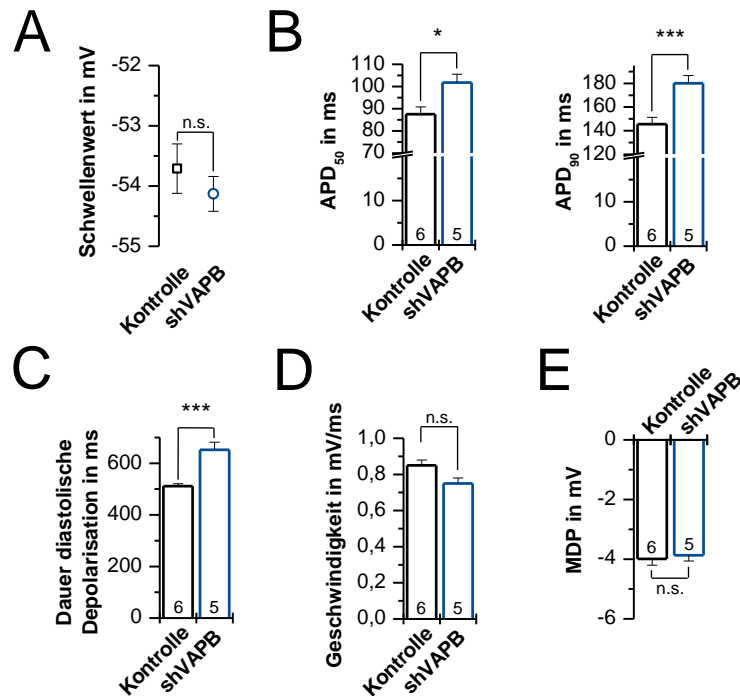


Abbildung 3.34 Die shVAPB führt zu einer Verlängerung der diastolischen Depolarisation, sowie APD₅₀ und APD₉₀

A Der Schwellenwert ist unverändert zwischen den Kontrollzellen ($-53,7 \pm 0,4$ mV, $n=6$) und den mit shVAPB transfizierten HL-1 Zellen ($-54,1 \pm 0,3$ mV, $n=5$). **B** Die APD₅₀ und APD₉₀ sind jeweils signifikant in ihrer Dauer verlängert. Die APD₅₀ der Kontrollzellen ($87,5 \pm 3,3$ ms, $n=6$) war um circa 30 ms schneller als die der shVAPB transfizierten Zellen ($101,8 \pm 3,8$ ms, $n=5$). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der APD₉₀, die ebenfalls signifikant verlängert war im Falle der shVAPB transfizierten Zellen (Kontrolle: $145,6 \pm 5,8$ ms ($n=6$); shVAPB $180,1 \pm 6,6$ ms ($n=5$)). **C** Zusätzlich konnte eine Verlängerung der diastolischen Depolarisation festgestellt werden. Die diastolische Depolarisation der Kontrollzellen mit $511,6 \pm 9,5$ ms ($n=6$) wurde durch die Transfektion mit shVAPB signifikant auf eine Dauer von $652,2 \pm 29,6$ ms ($n=5$) erhöht. **D** Die Geschwindigkeit des Aufstiegs ($0,9 \pm 0,03$ mV/ms im Vergleich zu shVAPB mit $0,8 \pm 0,03$ mV/ms) lag unverändert vor. **E** Das MDP wurde durch eine Transfektion mit shVAPB nicht beeinflusst (Kontrolle: $-4,0 \pm 0,2$ mV; shVAPB $-3,9 \pm 0,2$ mV).

Die Veränderung der Frequenz in HL-1 Zellen resultiert daher im Wesentlichen aus der Verlängerung der diastolischen Depolarisation und der Verlängerung der Aktionspotentialdauer.

3.7 VAPB „Knock-Out“-Mäuse zeigen einen kardialen Phänotyp

Die VAPB „Knock-Out“ Mäuse wurden durch eine Kollaboration mit Luc Dupius (Straßburg) zur Verfügung gestellt. Die VAPB „Knock-Out“-Mäuse (VAPB^{-/-}) sind entwicklungs- und fortpflanzungsfähig, zudem weitestgehend phänotypisch unauffällig (Kabashi et al. 2013). In den Experimenten von Kabashi *et al.* zeigten sie lediglich milde motorische Defizite nach 18 Monaten, sodass man von einer altersabhängigen Entwicklung neuronaler Defekte sprechen kann, jedoch ohne einen Effekt auf die Muskelstärke zu haben. Somit schwächt der VAPB-„Knock-Out“ zwar das motorische System, führt jedoch nicht zu einem ALS Phänotyp (Kabashi et al. 2013).

3.7.1 Die VAPB „Knock-Out“-Mäuse zeigen eine verlangsamte Herzschlagrate bei „Tail Cuff“ Messungen

Zur Bestimmung des Blutdrucks und der Herzschlagrate wurden so genannte „Tail Cuff“ Messungen durchgeführt. Hierbei werden die Mäuse in eine Apparatur eingespannt und sowohl der Blutdruck als auch die Herzschlagrate am Schwanz gemessen. In Abbildung 3.35 sind die Ergebnisse der Experimente zusammengefasst. Es konnten keine Unterschiede in der Systole, Diastole oder dem Mittelwert des Blutdrucks zwischen den Wildtyp-Geschwistertieren (VAPB^{+/+}) und den VAPB „Knock-Out“-Mäusen (VAPB^{-/-}) beobachtet werden. Allerdings war die Herzschlagrate der „Knock-Out“-Mäuse deutlich verlangsamt im Vergleich zu den untersuchten Geschwistertieren.

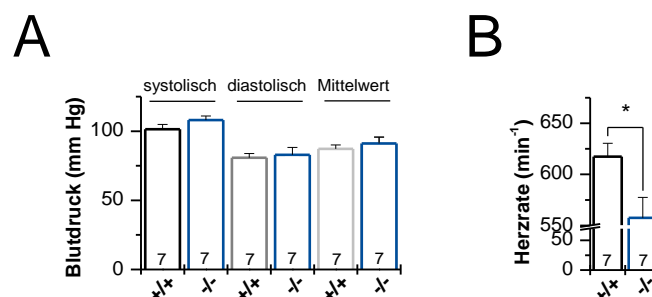


Abbildung 3.35 „Tail Cuff“ Messungen an den Schwanzenden der VAPB „Knock-Out“-Mäuse

A Die Bestimmung des Blutdrucks und Herzschlagrate erfolgte am Schwanz der „Knock-Out“-Mäuse. Hierbei zeigte sich weder während der Systole noch Diastole ein Unterschied zwischen den „Knock-Out“-Mäusen (Systole: $108,1 \pm 2,9$ mm HG; $n=7$, Diastole: $82,9 \pm 5,3$ mm HG; $n=7$) und den Wildtyp-Geschwistertieren (Systole: $101,4 \pm 3,5$ mm HG; $n=7$, Diastole: $80,8 \pm 3,0$ mm HG; $n=7$). Auch der Mittelwert zeigte keine signifikanten Veränderungen. **B** Jedoch deutliche Unterschiede konnten im Bereich der Herzschlagrate beobachtet werden. Die Wildtyp-Mäuse hatten eine Herzschlagrate von $617,3 \pm 13,1$ min⁻¹ ($n=7$) während die VAPB „Knock-Out“-Mäuse (VAPB^{-/-}) eine deutlich reduzierte Herzschlagrate von $557,2 \pm 20,0$ min⁻¹ ($n=7$) zeigten.

3.7.2 Die VAPB^{-/-} Mäuse zeigten im EKG eine Sinusbradykardie und ein LQT-Syndrom

Da die Bestimmung der Herzfrequenz über die Ableitung am Schwanz lediglich Informationen über die Schlagfrequenz gibt, wurden weiterführende Experimente an den VAPB^{-/-} Mäusen durchgeführt. Die Mäuse wurden hierfür im wachen Zustand mit Hilfe einer mobilen EKG Einheit (EMKA Technologies) gemessen. Diese Ergebnisse entstanden während einer Kollaboration mit Dr. Fabritz aus Birmingham. In Abbildung 3.36 sind Beispielmessungen der EKGs dargestellt. Deutlich zu erkennen sind die Unterschiede in der Herzschlagrate, jedoch auch morphologische Veränderungen des EKG Verlaufs.

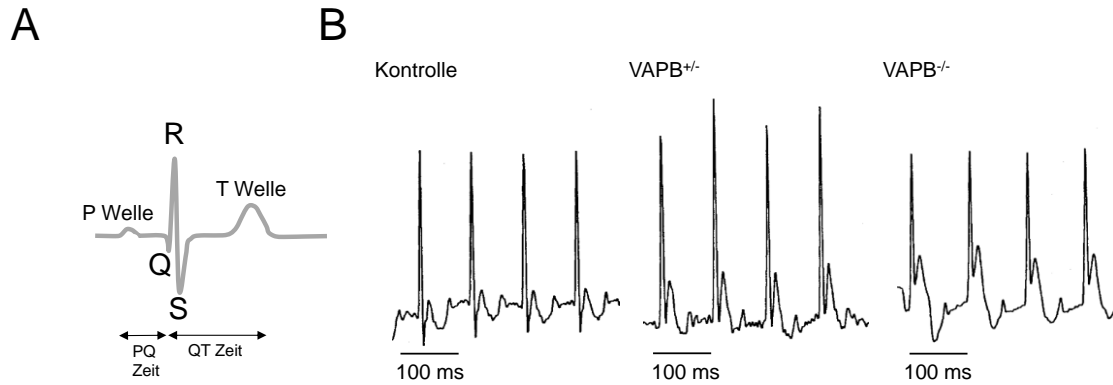


Abbildung 3.36 Beispiel-EGK Messungen der homo- und heterozygoten VAPB „Knock-Out“-Mäuse

A Schematische Darstellung einer EKG Messung, mit den entsprechenden Bezeichnungen, welche für die Auswertung verwendet wurden. **B** Kontrolltiere ($VAPB^{+/+}$) (links) sind Geschwistertiere der heterozygoten ($VAPB^{+/-}$) (Mitte) und homozygoten ($VAPB^{-/-}$) „Knock-Out“-Tiere (rechts) für VAPB. Bei den Tieren konnte beobachtet werden, dass die Herzschlagrate bei den homozygoten, also auch bei den heterozygoten Tieren signifikant abnimmt. Zusätzlich gibt es noch morphologische Veränderungen im Bereich der T-Welle.

Für die Messungen wurden Tiere unterschiedlichen Alters genommen. In Abbildung 3.37 sind die Daten der Tiere mit einem Durchschnittsalter von 82-83 Wochen zusammengefasst. Die $VAPB^{-/-}$ Mäuse (dunkelblau) zeigten eine deutliche Verlangsamung der Herzfrequenz gegenüber den Wildtyp-Geschwistertieren. Eine Verlangsamung der Herzschlagrate wird als Bradykardie bezeichnet. Zusätzlich verlängerten sich das RR Intervall, die QT Zeit und die frequenzkorrigierte QTc Zeit.

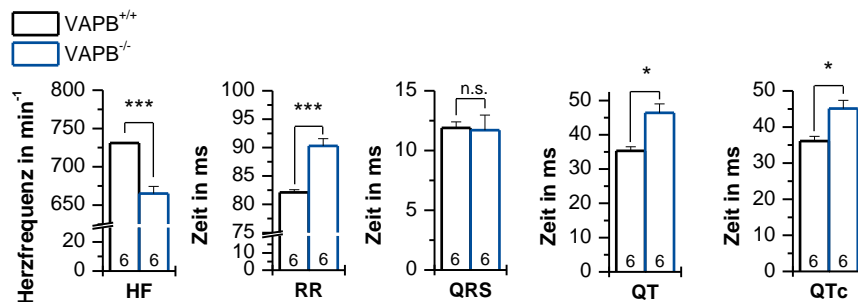


Abbildung 3.37 Die VAPB „Knock-Out“-Tiere zeigen eine verringerte Herzfrequenz, eine veränderte QT-Zeit und ein verlängertes RR-Intervall

Analysiert wurden folgende EKG Merkmale für VAPB Wildtyp $^{+/+}$ Tiere (schwarz) und $VAPB^{-/-}$ Mäuse (dunkelblau): HF (Herzfrequenz): $VAPB^{-/-}$ Mäuse ($665,0 \pm 9,5 \text{ min}^{-1}$; $n=6$) zeigen eine verringerte Herzschlagrate gegenüber den Wildtyp Tieren ($731,0 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$; $n=6$); RR (RR-Intervall): Wildtyp $^{+/+}$ ($82,1 \pm 0,5 \text{ ms}$; $n=6$) und $VAPB^{-/-}$ ($90,3 \pm 1,3 \text{ ms}$; $n=6$); QRS (QRS Komplex) $VAPB^{+/+}$ ($11,9 \pm 0,5 \text{ ms}$; $n=6$) und $VAPB^{-/-}$ ($11,7 \pm 0,3 \text{ ms}$; $n=6$); QT (QT Intervall): $VAPB^{+/+}$ ($35,3 \pm 1,2 \text{ ms}$; $n=6$) und $VAPB^{-/-}$ ($46,4 \pm 2,6 \text{ ms}$; $n=6$); QTc (frequenzkorrigierte QT Zeit - QT/\sqrt{RR}): Wildtyp $^{+/+}$ ($36,1 \pm 1,3 \text{ ms}$; $n=6$) und $VAPB^{-/-}$ ($45,1 \pm 2,3 \text{ ms}$; $n=6$).

Neben den „Knock-Out“-Tieren ($VAPB^{-/-}$) wurden heterozygote Tiere ($VAPB^{+/-}$) im selben Alter untersucht. Im Gegensatz zu den homozygoten „Knock-Out“-Mäusen zeigten diese lediglich die gleiche Tendenz und keine signifikanten Unterschiede in den

Parametern Herzfrequenz, RR-Intervalldauer, Dauer des QRS-Komplexes, QT-Zeit und in der frequenzkorrigierten QT-Zeit (QTc). Der Phänotyp der Bradykardie benötigt daher einen vollständigen Verlust des VAPB-Proteins.

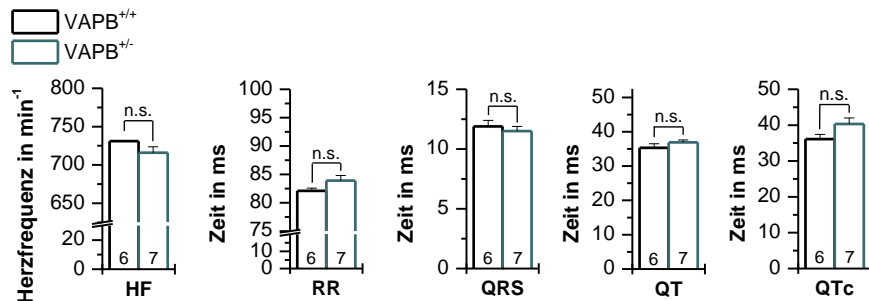


Abbildung 3.38 Die heterozygoten VAPB^{+/-} Mäuse zeigen keinen signifikanten Phänotyp

Die Analyse der EKG Daten für die heterozygoten Tiere (graugrün) erfolgte nach denselben Parametern, wie die Analyse der „Knock-Out“-Tiere. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen im EKG, jedoch eine Tendenz, die ähnlich der „Knock-Out“-Mäuse ist. Wildtyp-Mäuse und Ergebnisse entsprechen denen aus Abbildung 3.37. HF (Herzfrequenz): Wildtyp^{+/+} ($731,0 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$; n=6) und VAPB^{+/-} ($716,0 \pm 7,7 \text{ min}^{-1}$; n=7); RR (RR-Intervall): Wildtyp^{+/+} ($82,1 \pm 0,5 \text{ ms}$; n=6) und VAPB^{+/-} ($83,9 \pm 0,9 \text{ ms}$; n=7); QRS (QRS Komplex) Wildtyp^{+/+} ($11,9 \pm 0,5 \text{ ms}$; n=6) und VAPB^{+/-} ($11,5 \pm 0,4 \text{ ms}$; n=7); QT (QT Zeit): Wildtyp^{+/+} ($35,3 \pm 1,2 \text{ ms}$; n=6) und VAPB^{+/-} ($39,9 \pm 1,7 \text{ ms}$; n=7); QTc (frequenzkorrigierte QT Zeit - QT/\sqrt{RR}): Wildtyp^{+/+} ($36,1 \pm 1,3 \text{ ms}$; n=6) und VAPB^{+/-} ($40,3 \pm 1,7 \text{ ms}$; n=7).

Häufig treten Herzrhythmusstörungen und weitere Auffälligkeiten im EKG erst mit fortschreitendem Alter der Mäuse auf. Daher wurden zusätzlich junge Mäuse mit einem Durchschnittsalter von 21 Wochen auf einen kardialen Phänotyp untersucht (Abbildung 3.39). Im Falle des VAPB „Knock-Outs“ ist ein altersunabhängiger Phänotyp zu beobachten, welcher schon bei einem niedrigen Alter auftritt. In der Abbildung 3.39 sind die Daten der EKG Messungen für verschiedene Parameter dargestellt. Neben den VAPB^{-/-} Mäusen (dunkelblau) wurden ebenfalls heterozygote Tiere (VAPB^{+/-}, graugrün) untersucht. Die jungen Mäuse zeigten wie auch die älteren Mäuse einen signifikante Veränderung in den Werten für Herzfrequenz, Dauer des RR Intervalls, QT Zeit und der QTc Zeit. Sie zeigen denselben Phänotyp, wie die VAPB^{-/-} Mäuse mit einem Alter von durchschnittlich 82 Wochen. Die Dauer des RR Intervalls war signifikant verlängert im Falle der „Knock-Out“-Tiere. Heterozygote Tiere (VAPB^{+/-}) waren auch im Falle der jüngeren Tiere unauffällig gegenüber ihren Wildtyp-Geschwistertieren.

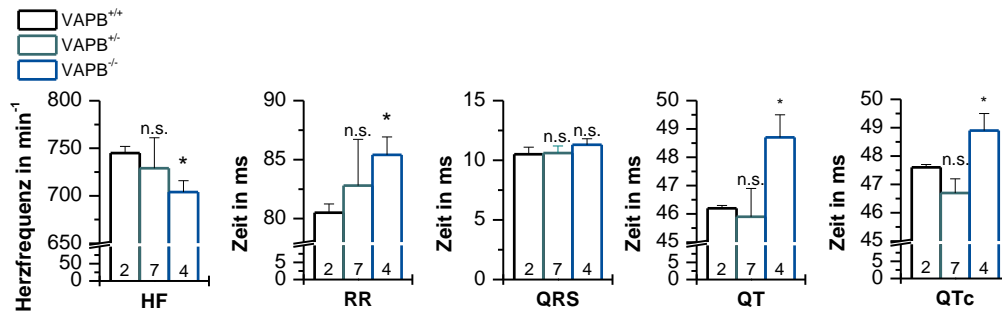


Abbildung 3.39 Analyse der EKG Messungen junger Tiere

Die jungen Tiere wurden für dieselben Parameter getestet, wie die Tiere mit einem Durchschnittsalter von 82-83 Wochen. In dieser Abbildung sind die Auswertungen für die Kontrolltiere (VAPB^{+/+}, schwarz), die heterozygoten Mäuse (VAPB^{+/-}, graugrün) und die VAPB „Knock-Out“-Mäuse (VAPB^{-/-}, dunkelblau) dargestellt. Folgende Parameter wurden bestimmt: Herzrate: VAPB^{+/+} (745,0 ± 7,0 min⁻¹; n=2); VAPB^{+/-} (729,0 ± 32,0 min⁻¹; n=4) und VAPB^{-/-} (704,0 ± 12,0 min⁻¹; n=7); Auswertung der Dauer des RR Intervalls. VAPB^{+/+} (80,50 ± 0,74 ms; n=2); VAPB^{+/-} (82,80 ± 3,92 ms; n=4) und VAPB^{-/-} (85,4 ± 1,5 ms; n=7); QRS (QRS Komplex) VAPB^{+/+} (10,5 ± 0,6 ms; n=2) und VAPB^{+/-} (10,6 ± 0,6 ms; n=7) VAPB^{-/-} (11,3 ± 0,5; n=4); QT Zeit: VAPB^{+/+} (46,2 ± 0,1 ms; n=2) und VAPB^{+/-} (45,9 ± 1,0 ms; n=7) VAPB^{-/-} (48,7 ± 0,8; n=4); frequenzkorrigierte QT Zeit (QTc): VAPB^{+/+} (47,6 ± 0,1 ms; n=2) und VAPB^{+/-} (46,7 ± 0,5 ms; n=7) VAPB^{-/-} (48,9 ± 0,6; n=4).

Die EKG Messungen der VAPB „Knock-Out“-Tiere zeigten, dass das VAPB-Protein eine physiologische Relevanz auf die Herzfrequenz hat. Das Fehlen des Proteins führt zu einer verlangsamten Herzschlagrate (Bradykardie) und einer Verlängerung des RR-Intervalls, sowie QT- und QTc-Zeit. Diese Parameter werden alle durch den I_f -Strom reguliert. Somit kann ein direkter Zusammenhang zwischen dem Phänotyp der Bradykardie, sowie der Anwesenheit oder Abwesenheit des VAPB-Proteins und der damit verbundenen Modulation des I_f -Stromes gesehen werden.

4 Diskussion

4.1 „GST-Pulldown“-Experimente weisen eine Protein-Protein Interaktion mit dem HCN2-Kanal nach

In den Hefeexperimenten konnte gezeigt werden, dass VAPB an den HCN2-Kanal bindet (Walecki 2011). Ein Nachweis der tatsächlichen Proteininteraktion ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Bei Hefezellen handelt es sich zwar um eukaryotische Zellen, sie gehören jedoch zum Reich der Pilze. Proteine, die in Hefezellen exprimiert sind, unterscheiden sich in ihrer Proteinstruktur zu denen, die in Säugetierzellen translatiert wurden. Ursache hierfür sind unterschiedliche oder fehlende posttranslationale Modifikationen im Vergleich zu höheren Eukaryoten (Brückner et al. 2009). Um diese Problematik zu umgehen, wurden für die Interaktionsstudien HeLa-Zellen verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Zum Nachweis der Interaktion wurden „GST-Pulldown“-Experimente durchgeführt, welche eine spezifische Interaktion des VAPB-Proteins mit dem HCN2-Kanal zeigten.

4.1.1 VAPB, VAPA, VAMP1 und VAMP2 interagieren mit dem HCN2-Kanal in GST-„Pulldown“-Experimenten

Ein „GST-Pulldown“ von HCN2 aus einem HeLa Lysat kann keine Aussage treffen, ob es sich um eine indirekte oder direkte Bindung handelt. In HeLa-Zellen konnten die Proteine VAPA und VAPB mittels Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Teuling et al. 2007). Insbesondere VAPA ist in HeLa-Zellen nachweislich exprimiert und könnte die Ergebnisse beeinflussen (Weir et al. 2001). Die Proteine VAMP1 und VAMP2 werden ebenfalls exprimiert (Uhlén et al. 2015). Alle genannten Proteine interagieren im „Pulldown“ mit dem HCN2-Kanal (Abbildung 3.1). Daher geben die durchgeführten „GST-Pulldowns“ keine eindeutige Antwort, ob das VAPB-Protein direkt oder indirekt über einen Komplex mit dem HCN2-Kanal interagiert. Bei der Verwendung von Zelllysaten können indirekte Interaktionen, vermittelt über Proteinkomplexe, nicht ausgeschlossen werden. Auch im Lysat, welches aus dem Gehirn der Ratte gewonnen wurde, sind alle genannten Proteine repräsentiert. Unter nativen Bedingungen konnte somit ebenfalls eine Interaktion aller Proteine mit dem HCN2-Kanal nachgewiesen werden, jedoch in unterschiedlichen Intensitäten (Abbildung 3.2).

Während sowohl das VAPB-, als auch das VAMP1- und VAMP2-Protein schwächer zu interagieren scheinen, fiel insbesondere eine starke HCN2-Bande im „Pulldown“ des VAPA-Proteins auf. Dies führte zur Hypothese, dass das VAPA-Protein die Interaktion mit dem HCN2-Kanal vermitteln könnte.

4.1.2 VAPB und der HCN2-Kanal interagieren mittels direkter Protein-Protein Interaktion

Um nachweisen zu können, dass die Interaktion zwischen VAPB und HCN2 direkt ist, war es notwendig, isolierte Proteine zu verwenden. Die GST-Proteine sind aufgrund des Bindschritts an die Beads bereits mehrfach gewaschen und ein Vorhandensein von bakteriellen Proteinen kann somit ausgeschlossen werden (Nachweis mittels Coomassie-Gel, Daten nicht gezeigt). Das HCN2-Protein sollte ebenfalls isoliert vorliegen, um auszuschließen, dass weitere Proteine an der Interaktion mit dem VAPB-Protein beteiligt sind. Dadurch war es nötig, dass HCN2-Protein mittels *in vitro* Translation zu synthetisieren. Hierzu wurde das TnT® Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) verwendet. Das hierzu verwendete System basiert auf einem Retikulozytenlysats, welches zusätzlich eine RNA Polymerase und Nukleotide enthält. Als Vorlage für die Proteintranslation dient ein Plasmid, welches für das gewünschte Protein codiert. Somit kann ausgeschlossen werden, dass außer dem translatierten Protein und denen für die Proteintranslation benötigten Enzymen, weitere Proteine im Lysat nachweisbar sind. Die „GST-Pulldown“-Experimente zeigten, dass VAPB nur noch geringfügig mit dem HCN2-Kanal interagiert (Abbildung 3.3). Eine besonders deutliche Interaktion konnte beim VAPA-Protein beobachtet werden, dass erneut die Hypothese aufkommen lässt, dass die Interaktion über das VAPA-Protein vermittelt oder verstärkt wird und das VAPB-Protein in einem Komplex wirkt. In Abbildung 3.4 ist, neben der HCN2-Detektion mittels Antikörperfärbung im Western Blot, ebenfalls dargestellt, dass das VAPB-Protein an das GST-VAPA bindet. Endogenes VAPB-Protein (Uhlén et al. 2015) aus dem HeLa Lysat ist im „Pulldown“ mit GST-VAPA nachweisbar, sodass es in einem stabilen Komplex gebunden sein muss. Allerdings kann mit diesem Versuch nicht nachgewiesen werden, ob das VAPB-Protein zusätzlich an den HCN2-Kanal oder lediglich an das GST-VAPA-Protein bindet.

4.2 Das VAPB-Protein moduliert lediglich die Stromamplitude des HCN1- und HCN2-Kanals

HCN-Kanäle leiten bei einem negativen Membranpotential Einwärtsströme. Eine frühere Studie zeigte, dass die Amplitude dieser Ströme durch das VAPB-Protein moduliert wird (Walecki 2011). Ungeklärt blieb in dieser Studie jedoch, auf welchem Mechanismus die Stromamplitudenvergrößerung beruht. Die Ursachen für eine Veränderung der Stromamplituden könnten in einer Veränderung des „Gatings“ oder „Traffickings“ des HCN2-Kanals liegen. Zur Untersuchung eines möglichen „Gating“ Effekts wurde die Spannungsabhängigkeit des HCN2-vermittelten Stromes mit und ohne Ko-Expression des VAPB-Proteins untersucht. Es konnten keine Unterschiede beobachtet werden, keine der verwendeten VAPB Konzentrationen hatte einen Einfluss auf die halbmaximale Spannung der Aktivierung (Abbildung 3.5). Rückschlüsse aus den Ergebnissen sind nur vorsichtig zu ziehen, da die Experimente in einem heterologen Expressionssystem durchgeführt wurden und es sich hierbei nicht um Säugetierzellen handelt. Insbesondere „Gating“ Effekte können im Falle des cAMP- modulierten HCN-Kanals in Oozyten nur teilweise untersucht werden. Oozyten verfügen über einen sehr hohen durchschnittlichen intrazellulären cAMP Spiegel von circa 1-3 μM (Maller, Butcher und Krebs 1979). HCN-Kanäle werden aufgrund ihrer Bindestelle für cAMP, der CNBD, konzentrationsabhängig durch cAMP reguliert (Hu et al. 2013). Hohe Konzentrationen an cAMP (100 μM) verursachen in „Inside-Out-Patches“ eine Verschiebung der Spannung der halbmaximalen Aktivierung von bis zu +20 mV zu mehr positiven Potentialen (Hu et al. 2013; Zolles et al. 2006). Unter „Inside-Out Patch“ versteht man, dass ein Stück der Membran (englisch „Patch“) mittels einer Glaselektrode herausgerissen wird. Hierdurch befindet sich die zum Zellinneren gerichtete Membranseite nun extrazellulär in der Badlösung. Daher ist die Pipettenlösung in der Glaselektrode an den Eigenschaften der Extrazellulärlösung angepasst. Vorteil an dieser Methode ist, dass intrazellulär wirkende Moleküle ausgewaschen werden können und eine leichte Applikation möglich ist. Werden die $\Delta V_{1/2}$ Werte (Veränderung der Spannung gegenüber 0 μM cAMP) gegen die Konzentration an eingesetztem cAMP aufgetragen, so kann die Konzentration bestimmt werden, die benötigt wird, um die halbmaximale Verschiebung $V_{1/2}$ zu erreichen. Diese liegt in der „Inside-Out“ Konfiguration für cAMP in Oozyten bei 80 nM (Hu et al. 2013). Diese niedrige halbmaximale Effektivität von 0,08 μM ist um das bis zu 40-fache niedriger als die in Oozyten vorherrschenden intrazelluläre cAMP Konzentration von 1-3 μM . Daher kann davon ausgegangen werden, dass die gemessene $V_{1/2}$ in Oozyten bereits maximal zu positiveren Potentialen verschoben ist.

Sollte das VAPB-Protein also das „Gating“ des Kanals beeinflussen, so ist dies in Oozyten, aufgrund des hohen cAMP Spiegels, nicht auflösbar. Eine Modulation der $V_{1/2}$ kann lediglich in der „Inside-Out“ Konfiguration ausgeschlossen werden, da die hohe Konzentration des cAMPs der Oozyte ausgewaschen wird. In einer Kooperation mit Prof. Dr. Baukrowitz der Universität Kiel wurden „Inside-Out-Patch“-Experimente zur Bestimmung der Spannungsabhängigkeit durchgeführt. In den elektrophysiologischen Untersuchungen zeigte sich, dass das VAPB-Protein bei einer Ko-Expression keinen Einfluss auf die $V_{1/2}$ des HCN2-Kanals hat (Daten nicht gezeigt). In den TEVC Messungen zeigte sich, dass das VAPB-Protein in Oozyten keinen Einfluss auf die Kinetik des HCN2-vermittelten Stromes, d.h. die Schnelligkeit der Aktivierung (Zeitkonstante τ) hat. Die Aktivierungskinetik ist indirekt durch Bindung des cAMPs an die CNBD moduliert und ist nicht über Proteinkinasen durch einen Signalweg vermittelt (Biel et al. 2009; Herrmann et al. 2011). Durch das Binden von cAMP an den HCN-Kanal wird die Aktivierungskinetik der jeweiligen Untereinheit scheinbar beschleunigt (Biel et al. 2009). Durch die Verschiebung der $V_{1/2}$ zu mehr positiven Potentialen öffnet der HCN-Kanal früher und somit erscheint der Kanal bei positiveren Potentialen schneller in seiner Aktivierungskinetik. Aufgrund des hohen cAMP Spiegels in Oozyten (Maller et al. 1979) ist daher ebenfalls keine Veränderung der Kinetik zu erwarten. Zur Überprüfung der Kinetik kommen daher ebenfalls „Inside-Out-Patches“ in Frage. Neben Effekten auf die Stromeigenschaften könnte das VAPB-Protein auch einen Einfluss auf die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals aufweisen. Bei hohen Mengen des VAPB-Proteins könnte die Retention des HCN2-Proteins in intrazellulären Kompartimenten ein wesentlicher Grund für die verringerte Stromamplitude sein. Prosser *et al.* postulierten, dass das VAPA-Protein starre Membrandomänen formen könnte, welche als Bereich für die Proteinfaltung und die Assemblierung von Membranproteinen verantwortlich sind. Bei einer Überexpression zeigten sie, dass sowohl VAPB, als auch VAPA, zu einer Retention von Proteinen führt. Vermittelt wird dies durch eine Störung der lateralen Diffusion von Membranproteinen und deren Einbindung in Transportvesikel (Prosser et al. 2008). Zur weiteren Untersuchung wurden daher Chemilumineszenz-basierte Oberflächenexpressionsassays durchgeführt. Die Diskussion dieser Daten erfolgt in Kapitel 4.5.

Bei der Untersuchung auf eine Veränderung der Pharmakologie durch das VAPB-Protein wurde festgestellt, dass die Bindung des VAPB-Proteins an den HCN2-Kanal keinen Einfluss auf die Wirkungsweise des HCN-Blockers ZD7288 hat (Abbildung 3.6). Der Mechanismus der Wirkung des ZD7288 erfolgt intrazellulär nach Öffnen des Kanals. Der Blocker gelangt über die Zellemembran ins Zellinnere und kann bei einer

spannungsabhängigen Öffnung der Pore in die Kavität gelangen und den Kanal blockieren (Harris und Constanti 1995; Cheng et al. 2007). Harris und Constanti (1995) postulierten, dass es dem Blocker durch quaternäre Ammoniumverbindungen mit lipophilen Charaktereigenschaften ermöglicht wird, die Membran mittels langsamer Diffusion zu passieren. Der Blocker ZD7288 bindet an die Aminosäuren Alanin 425 und Isoleuzin 432 der Transmembrandomäne S6 des HCN2-Kanals, welche in die zentrale wassergefüllte Porenkavität zeigen (Cheng et al. 2007). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass VAPB und ZD7288 nicht um dieselbe Bindestelle konkurrieren. Im Gegensatz zum Blocker ZD7288 bindet das VAPB-Protein an den N-Terminus des HCN2-Kanals (Walecki 2011) und nicht an die genannten Aminosäuren in der Kanalpore. Entsprechend hat das Binden des VAPB-Proteins keinen Einfluss auf die Effektivität und Wirkungsweise des Kanalblockers ZD7288.

4.2.1 Die Interaktion des HCN-Kanals mit dem VAPB-Protein ist HCN-selektiv

Die Modulation mittels VAPB ist nicht nur selektiv für die Familienmitglieder der HCN-Familie (Abbildung 1.8; Walecki 2011), sondern weist zusätzlich eine hohe Spezifität für die HCN-Familie auf. Keiner der getesteten Ionenkanäle wurde durch das VAPB-Protein moduliert (Abbildung 3.7). Von großem Interesse war der Einfluss des VAPB-Proteins auf Aktionspotentiale und somit die Frequenz kardialer Zellen. Daher lag der Expressionsort, der untersuchten Ionenkanäle im Herzen (Kir2.1; Kv1.4; Kv1.5; Kv4.3; und KvLQT1). Sie alle sind am Ablauf des Aktionspotentials beteiligt (Grant 2009; Roden et al. 2002). Eine Mutation würde im Falle des Kir2.1, welcher einen Anteil am I_{K1} bildet, zu ventrikulären Arrhythmien (Andersen Syndrom) führen (Roden et al. 2002; Tristani-Firouzi und Etheridge 2010). Kv1.4 (I_{to}), Kv1.5 (I_{Kur}), KvLQT1 (I_{Ks}) und Kv4.3 (I_{to}) sind an der Repolarisation der Membran nach einem Aktionspotential beteiligt (Roden et al. 2002, Modell und Lehmann 2006). Entsprechend führt ein Funktionsverlust zu einer Verlängerung des Aktionspotentials und daraus resultierend zu einem „Long QT Syndrom“ (Grant 2009; Roden et al. 2002). Ein Verlust oder Gewinn der Funktion vermittelt durch das VAPB-Protein könnte daher zu einem kardialen Phänotyp führen. In den Oozyten-Experimenten zeigte sich, dass das VAPB-Protein keinen der genannten Ionenkanäle in seiner Stromamplitude moduliert. Aufgrund der fehlenden Modulation kann daher geschlossen werden, dass der in dieser Arbeit beschriebene kardiale Phänotyp (Kapitel 3.6 und 3.7) maßgeblich auf eine direkte Modulation des HCN-Stroms durch das VAPB-Protein zurückzuführen ist.

4.2.2 Die P56S Mutante in VAPB führt nur zum Teil zum Verlust der HCN2-Modulation

Das VAPB-P56S-Protein, eine beschriebene Mutante des VAPB-Proteins, bildet laut Literatur Proteinaggregate im Zytosol, was zu einem Funktionsverlust führt und schlussendlich zum Phänotyp der amyotrophen Lateralsklerose 8 beiträgt (ALS8) (Nishimura et al. 2004).

Transgene Tiere, die eine P56S Mutation tragen, weisen fortschreitende Hyperaktivität und weitere motorische Defizite auf (Aliaga et al. 2013). Die TEVC Daten mit VAPB-P56S zeigten, dass das mutante VAPB bei starker Überexpression in der Lage ist, den HCN2-Kanal zu modulieren und damit kein vollständiger Funktionsverlust auftritt (Abbildung 3.12). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das VAPB-Protein über seine Transmembrandomäne mit dem HCN2-Kanal interagiert. Die Mutation des VAPB-P56S liegt jedoch in dessen MSP Domäne, die wiederum an der Oligomerisierung mit VAPB oder VAPA beteiligt ist (Lev et al. 2008). Entsprechend könnte diese Oligomerisierung gestört sein und zur typischen Aggregationsbildung des VAPB-P56S führen (Nishimura et al. 2004). Dies schließt jedoch nicht aus, dass eine Interaktion mit dem HCN-Kanalprotein stattfinden kann (Abbildung 3.12). Die fehlende Stromamplitudenvergrößerung durch das VAPB-P56S Protein könnte durch die fehlende Dimerisierung des VAPB- oder VAPA- Proteins erklärt werden (Lev et al. 2008). Zusätzlich zeigten Teuling *et al.*, dass das VAPB-P56S eine Interaktion mit Proteinen verhindert, die ein FFAT-Motiv enthalten. Die fehlende Interaktion mit dem FFAT-Motiv führt zu einem Verlust der Adressierung des Proteins an das ER (Kaiser et al. 2005) und es kommt zu einer Retention des Proteins. Die Mutation des VAPB-P56S führt zu einer Aggregation und zusätzlich zur Rekrutierung der endogenen VAPB und VAPA Proteine (Teuling et al. 2007). Auch in diesem Fall könnte die Menge ausschlaggebend sein für eine Rekrutierung und die Auswirkungen des mutanten VAPB-P56S. In geringen Konzentrationen könnte der Effekt gemäßigt ausfallen. Lediglich die laterale Diffusion von Membranproteinen und deren Einbindung in Transportvesikel könnte gestört sein, sodass lediglich die Stromamplitudenvergrößerung und die Zunahme der Oberflächenexpression verhindert werden. Die Stromamplitudenreduktion bei hohen Konzentrationen des VAPB-P56S hätte die gleichen Auswirkungen wie eine Überexpression des VAPA- oder VAPB-Proteins.

4.2.3 VAMP1- und VAMP2-Proteine modulieren die Stromamplitude des HCN2-Kanals

Wie bereits erwähnt, sind auch VAMP1 und VAMP2 in der Lage, den HCN2-Kanal zu modulieren. Sie gelten als Interaktionspartner des VAPA-Proteins (Skehel et al. 1995; Weir et al. 1998) und sind Teil des SNARE Komplexes, welcher an Exozytose von Vesikeln beteiligt ist (Schoch et al. 2001). Die am SNARE Komplex beteiligten Proteine VAMP1 und VAMP2 könnten gemeinsam mit dem VAPA und VAPB eine weitere Funktion haben und Teil eines Komplexes sein, der die Modulation des HCN-Kanals vermittelt. Als Ergebnis der „GST-Pulldown“-Experimente konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass VAPB vermutlich mit VAPA, VAMP1 und VAMP2 in einem Komplex vorliegt. Das VAMP1-Protein hat zwei verschiedene Spleißformen. Während das VAMP1A an der Zellmembran und in Endosomen vorkommt, liegt die Spleißvariante VAMP1B in Mitochondrien vor (Isenmann et al. 1998). In der vorliegenden Studie wurde jedoch lediglich die Spleißvariante VAMP1A verwendet. Die Spleißvariante VAMP1B wurde aufgrund ihrer Lokalisation in Mitochondrien für eine Interaktion mit dem HCN2-Kanal ausgeschlossen. Die Stromamplitudenvergrößerung durch eine Ko-Expression mit VAMP1 (Abbildung 3.10) könnte daher auf einer direkten Interaktion des VAMP1-Proteins mit dem HCN2-Kanal an der Plasmamembran zustande kommen.

In Neuronen konnte gezeigt werden, dass das VAMP2-Protein sich im Wesentlichen im axonalen Bereich des Neurons und nicht in den Dendriten aufhält (Sampo et al. 2003). Sampo *et al.* postulierten, dass das VAMP2-Protein zwar zur Membran der Dendriten transportiert wird, jedoch aufgrund einer schnellen Endozytose nicht akkumuliert. Vermittelt wird dies über ein Endozytosesignal im C-Terminus des VAMP2-Proteins (Sampo et al. 2003). Die Stromamplitudenreduktion könnte in Oozyten (Abbildung 3.11) daher durch eine vermehrte Endozytose des VAMP2-Proteins erklärt werden. Das gebundene HCN2-Protein könnte dem VAMP2-Protein in die Endosomen folgen. Im Gegenzug dazu zeigte sich in den „GST-Pulldowns“ der *in vitro*-Translation (Abbildung 3.3) und aus Gewebe (Abbildung 3.2), dass das VAMP2-Protein eine geringere Affinität zum HCN2-Kanal aufweist. Die fehlende Modulation bei geringen Mengen könnte auf diese verringerte Bindung an den HCN2-Kanal zurückzuführen sein.

4.2.4 Der HCN2-Kanal wird durch das Familienmitglied VAPA jedoch nicht durch VAPC moduliert

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben dem VAPB-Protein, auch das VAPA-Protein den HCN2-Kanal in seiner Stromamplitude modulieren kann (Abbildung 3.8). Das VAPA-Protein verfügt über einen ähnlichen Aufbau wie das VAPB-Protein und gehört zur Familie der VAP-Proteine (Nishimura et al. 1999). Eine Modulation durch das VAPA-Protein war aufgrund der Ähnlichkeit mit VAPB zu erwarten. So könnten VAPA und VAPB Heterodimere ausbilden und anschließend über das VAPA-Protein vermittelt an den HCN2-Kanal, sowie an VAMP1 oder VAMP2 binden. Zwar reduziert das VAMP2-Protein die Stromamplitude des HCN2-Kanals (Abbildung 3.11), doch könnte dieser Effekt lediglich auf der Überexpression des VAMP2-Proteins beruhen. Das VAMP2-Protein könnte in seiner endogenen Konzentration am Komplex beteiligt sein und die Vergrößerung der Stromamplitude des HCN2-Kanals vermitteln. In *Xenopus laevis* Oozyten sind neben dem endogenen VAPB-Protein (Klein et al. 2002), das VAMP1-Protein (Cha et al. 2011), das VAMP2-Protein (Knecht et al. 1995) und das VAPA-Protein (Klein et al. 2002) ebenfalls exprimiert. Durch die Überexpression des VAPB-Proteins verändert sich der Expressionslevel, jedoch könnte das VAPB-Protein mit den endogen vorhandenen Proteinen interagieren. Bei den TEVC-Messungen zur Erfassung der Stromamplituden der Mitglieder der VAP-Proteinfamilie fiel eine fehlende Modulation durch das VAPC-Protein auf (Abbildung 3.9). Das VAPC-Protein entsteht durch das alternative Spleißen der VAPB Isoform und resultiert in einem verkürzten Protein, welchem Teile der Coiled-Coiled Domäne und die Transmembrandomäne fehlen (Nishimura et al. 1999). Die fehlende Interaktion ist vermutlich auf die fehlende Transmembrandomäne zurückzuführen, die für eine Dimerisierung mit VAPB oder VAPB benötigt wird.

4.3 Die Interaktion zwischen dem HCN2-Kanal und dem VAPB-Protein wird durch dessen N-Terminus vermittelt

4.3.1 Der Mechanismus der Interaktion zwischen dem HCN2-Kanal und dem VAPB-Protein beruht auf dem N-Terminus des HCN2

Eine vorherige Studie zeigte, dass der HCN2-Kanal vermutlich über seinen N-Terminus mit dem VAPB-Protein interagiert (Walecki 2011). Ungeklärt blieb jedoch der Mechanismus der Interaktion und ob die Konzentrationsabhängigkeit des Effektes auf die Stromamplitude des HCN2-Kanals durch den N-Terminus vermittelt wird (Abbildung 3.21). Es zeigte sich, dass auch hohe Mengen des VAPB-Proteins keinen Einfluss auf die Stromamplitude eines N-terminal trunkierten HCN2-Kanals haben. Lvov *et al.* beschrieben 2008 erstmalig eine direkte Interaktion des VAMP2-Proteins mit einem Ionenkanal, nämlich dem spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.2. Die Bindung findet hierbei ähnlich wie bei VAPB und HCN2 über den N-Terminus des Kv1.2-Kanals statt (Lvov *et al.* 2008). VAMP2 ist als Teil des SNARE Komplexes am Transport des Proteins zur Plasmamembran beteiligt (Schoch *et al.* 2001). Neben dieser Transportfunktion beschleunigt VAMP2 die Inaktivierung des Kv1.2-Kanals und nimmt damit direkten Einfluss auf die Stromeigenschaften des Kanals (Lvov *et al.* 2008). Das VAPB-Protein hat im Gegensatz hierzu keinen Effekt auf die Stromeigenschaften des HCN2-Kanals, moduliert jedoch in Abhängigkeit von der Menge die Stromamplitude (Kapitel 1.4.2). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus des HCN2-Proteins essentiell für die Interaktion und die Modulation der Oberflächenexpression ist. So zeigte sich in Oberflächenexpressionsassays in Oozyten, dass ein Fehlen des N-Terminus zu einem Ausbleiben der Modulation durch das VAPB-Protein führt (Abbildung 3.24).

Hefe-Zwei-Hybrid Experimente (Walecki 2011) und die während dieser Arbeit durchgeführten TEVC Messungen von verschiedenen C-terminal trunkierten HCN2-Kanälen zeigten, dass der C-Terminus des Kanals für die Interaktion mit den VAP-Proteinen nicht essentiell ist. Allerdings kann eine Beteiligung des C-Terminus an der Bindung des VAPB-Proteins auch nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Es fällt auf, dass der Effekt auf die Stromamplitude bei Expression der C-terminal trunkierten HCN2-Mutanten gemäßiger ausfällt, als bei einer Ko-Expression des vollständigen HCN2-Kanal Proteins (Abbildung 1.8 und Abbildung 3.20). Viscomi *et al.* beschrieben, dass der C-Terminus mit intrazellulären Regionen des Kanals interagiert und somit das spannungsabhängige Öffnen des Kanals reguliert. Die intrazellulären Regionen, die mit

dem C-Terminus interagieren, befinden sich im N-Terminus des HCN2-Kanals (Viscomi et al. 2001). Entsprechend kann eine Interaktion des C-Terminus mit dem N-Terminus ebenfalls einen indirekten Einfluss auf die Bindung des VAPB-Proteins haben.

4.3.2 Die Transmembrandomäne des VAPB-Proteins vermittelt die Interaktion mit dem HCN2-Kanal

Zusätzlich konnte in Experimenten gezeigt werden, dass die Transmembrandomäne des VAPB-Proteins diese Interaktion vermittelt und diese bereits alleine in der Lage ist, die Stromamplitude des HCN2-Kanals zu erhöhen (Abbildung 3.23). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression durch eine Ko-Expression von VAPB-TM in Oozyten und HeLa-Zellen moduliert wird. Eine Ko-Expression führt zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression (Kapitel 3.5.2). Die Transmembrandomäne wurde bereits als notwendig für die Dimerisierung mit VAPA oder VAPB beschrieben (Lev et al. 2008). So könnte der Effekt der Transmembrandomäne auf die Stromamplitude und Oberflächenexpression auf eine Rekrutierung von endogenem VAPB- oder VAPA-Protein zurückführbar sein.

4.4 Das VAPB-Protein ko-lokalisiert mit dem HCN2-Kanal nach Ko-Transfektion, sowie in kortikalen Neuronen

4.4.1 VAPB und HCN2 zeigen nach Ko-Transfektion Übereinstimmungen im Expressionsmuster

Zur Ermittlung der Distribution von HCN2 und VAPB in Säugetierzellen wurden CHO-Zellen mit HCN2 eGFP (C-terminal markiert) und VAPB-dsRed transfiziert. Hierbei handelt es sich jedoch um ein Überexpressionsmodell. Es zeigte sich zu verschiedenen Zeitpunkten, dass sich das VAPB-Protein im Wesentlichen im ER befindet. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für den HCN2-Kanal. Beide Proteine ko-lokalisierten in diesem Kompartiment (Abbildung 3.14). Eine Umverteilung des HCN2-Kanals aufgrund der Anwesenheit des VAPB-Proteins konnte nicht beobachtet werden. Allerdings zeigte sich in den Oberflächenexpressionsassays (Kapitel 3.5), dass das VAPB-Protein (unmarkiert) durchaus in der Lage ist, die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals zu modulieren. In Neuronen zeigte sich außerdem, dass das unmarkierte VAPB-Protein in der Lage ist, die Verteilung des endogenen (unmarkiert) HCN2-Kanals zu beeinflussen (Kapitel 3.3.2). Als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse kommen unterschiedliche Faktoren in Frage. Zum einen spielt das dsRED-Tag des VAPB-Proteins eine Rolle. Ein wesentlicher Nachteil des dsRed-Proteins ist, dass es dazu neigt zu oligomerisieren (Baird, Zacharias und Tsien 2000). Diese Oligomerisierung könnte die Interaktion des dsRed-markierten VAPB-Proteins mit dem HCN2-Kanal behindern und somit ein falsches Ergebnis im Imaging ergeben. Entsprechend wurde in den nachfolgenden Experimenten auf das dsRED-Tag verzichtet und stattdessen ein lediglich HA-markiertes Konstrukt verwendet, welches nachweislich keinen Einfluss auf die biochemischen Eigenschaften hat (Kuijpers, van Dis et al. 2013; Teuling et al. 2007). Zum anderen könnte die Verwendung eines anderen HCN2-Konstruktes eine Rolle auf die Interaktion und das Trafficking der Proteine an die Membran spielen. Das Imaging in den CHO-Zellen wurde mit einem HCN2-Konstrukt durchgeführt, das über eine GFP-Markierung am C-Terminus verfügt. Das Markieren eines Proteins am C-Terminus kann negative Auswirkungen auf dessen Transport zur Zelloberfläche und die Proteinfaltung haben. HCN2-Kanäle verfügen über ein PDZ-Motiv in ihrem C-Terminus und interagieren über dieses mit verschiedenen Gerüstproteinen (Kimura et al. 2004). Kimura *et al.* zeigten, dass eine Interaktion mit dem Protein Mint2 über die PDZ-Domäne vermittelt wird und zu einer erhöhten Oberflächenexpression des HCN2-Kanals führt. Eine Markierung des HCN2-Kanals am C-Terminus könnte eine Interaktion mit der PDZ-Domäne behindern,

sodass es zu einer veränderten Oberflächenexpression und Anreicherung des Proteins im ER kommt. Im Imaging mit dem Konstrukt konnte nur eine geringfügige Oberflächenexpression beobachtet werden, jedoch eine starke Expression des HCN2-Kanals im ER (Kapitel 3.3). Für die Oberflächenexpressionsstudie und das dazugehörige Imaging (Kapitel 3.5.4) wurde ein HCN2-Konstrukt verwendet, welches N-terminal mit dem GFP markiert wurde und zusätzlich über ein HA-Epitop verfügt (Hardel et al. 2008). Hierdurch bleibt die PDZ-Domäne frei, resultierend in einer deutlich nachweisbaren gesteigerten Oberflächenexpression, die mit den TEVC Messdaten vereinbar ist.

4.4.2 Das VAPB-Protein bestimmt das Verteilmuster des HCN2-Kanals in kortikalen Neuronen

In der Literatur wurden bereits mehrere Mechanismen beschrieben, wie das VAPB-P56S das Krankheitsbild der ALS8 beeinflusst (Kuijpers et al. 2013). Kuijpers *et al.* beschrieben als einen Mechanismus, dass das VAPB-P56S dominant negativ wirksam ist und in der Lage ist, das Wildtyp-VAPB zu rekrutieren. Als weiterer Mechanismus wird eine gesteigerte Toxizität des VAPB P56S angesehen (Kuijpers et al. 2013). Kuijpers *et al.* (2013) postulierten jedoch, dass das mutante VAPB-Protein auch lediglich einen partiellen Funktionsverlust vermitteln kann (Kuijpers et al. 2013). Daher eignete sich das VAPB-P56S zur Simulation des Funktionsverlusts oder Funktionseinschränkungen des Wildtyp-VAPB in Neuronen. Bei den in Kapitel 4.4.1 verwendeten Zellkulturzellen handelt es sich nicht um polare Zellen, die einen gezielten Transport von Proteinen aufweisen. Die Zellpolarität entscheidet über bestimmte Funktionen innerhalb der Zelle. So sind Neurone in das Soma, Axone beziehungsweise Dendriten unterteilt, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Dendriten müssen zum Beispiel über eine Proteinausstattung verfügen, die es ihnen ermöglicht, eingehende exzitatorische oder inhibitorische Potenziale an das Soma weiterzuleiten. Die transfizierten Neurone zeigten, dass wenn das VAPB-Protein überexprimiert in den Neuronen vorliegt, eine in allen Kompartimenten nachweisbare Verteilung des HCN2-Kanals existiert und die beiden Proteine ko-lokalisieren. Wird stattdessen das VAPB-P56S transfiziert, konnte eine deutliche Umverteilung des HCN2 auf das Soma des Neurons und ein Verlust der Ko-Lokalisation in den Dendriten beobachtet werden. Dies könnte auf die in der Literatur beschriebene veränderte Morphologie der Dendriten bei einer Transfektion mit VAPB-P56S zurückgeführt werden (Teuling et al. 2007). Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Färbung mit MAP2 gezeigt werden, dass die Dendriten zwar degenerieren, jedoch

noch intakte Verzweigungen vorhanden sind (Abbildung 3.18) in denen eine Verteilung des HCN2-Kanals möglich ist. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass der HCN2-Kanal in seiner Distribution durch das VAPB-Protein beeinflusst wird. Das VAPB-P56S-Protein führt zu einer Umverteilung und Verlust der Ko-Lokalisation. VAPB könnte somit eine ähnliche Wirkungsweise auf den HCN2-Kanal haben, wie auf das Protein YIF1A (Yip1-interacting factor homologue A). VAPB ist essentiell für dessen Transport-Adressierung in die Dendriten und dessen Distribution. Die Interaktion der beiden Proteine wird ebenfalls über die Transmembrandomäne des VAPB-Proteins vermittelt (Kuijpers et al. 2013), vergleichbar mit der Bindung an den HCN2-Kanal. Der HCN2-Kanal könnte durch das VAPB-Protein eine Adressierung für den Transport in die Dendriten erhalten. Bei einem Funktionsverlust (VAPB-P56S) könnte daher dieses Signal ausbleiben und zu einer Akkumulation im Soma des Neurons führen. Auch im Modelorganismus *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass das VAPB sowohl für einen selektiven Transport von Proteinen in die Axone notwendig ist (Yang et al. 2012), als auch für die Aufrechterhaltung einer stabilen neuronalen Struktur (Forrest et al. 2013). Entsprechend wird eine Degeneration des Dendritennetzwerks bei einem Funktionsverlust des VAPB-Proteins erwartet.

4.5 VAPB moduliert die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals nach Ko-Expression in *Xenopus laevis* Oozyten oder HeLa-Zellen

4.5.1 Geringe Mengen an VAPB-Protein erhöhen bereits die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals

In den TEVC-Messungen zeigte sich, dass durch die Ko-Expression mit geringen Mengen an VAPB-Protein eine Amplitudenvergrößerung des HCN2-vermittelten Stromes in Oozyten beobachtet werden konnte. Bei höheren Mengen des VAPB-Proteins kommt es zu einer Erniedrigung der gemessenen Stromamplitude. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ursache für diese Modulation der Stromamplitude teilweise in einer Veränderung der Oberflächenexpression begründet liegt. Gegensätzlich zu der zuvor aufgestellten Hypothese, dass die Oberflächenexpression unverändert bleibt (Walecki 2011), konnte durch luminometrische Experimente in Oozyten und HeLa-Zellen gezeigt werden, dass das VAPB-Protein durchaus in der Lage ist, die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals zu verändern (Abbildung 3.22 und Abbildung 3.25). Die Oberflächenexpressions-Experimente als auch die TEVC Daten einer vorangegangenen Studie (Walecki 2011) konnten nicht reproduziert werden. Das Konstrukt mit einem extrazellulären HA-Epitop erwies sich als nicht funktional. Eine erneute Analyse der Daten, sowie neue Versuche mit einem neu klonierten Konstrukt zeigten eine signifikante Veränderung der Oberflächenexpression. Um sicherzustellen, dass das neu klonierte Konstrukt und das integrierte HA-Epitop keinen Einfluss auf dessen Modulation durch das VAPB-Protein haben, wurden Experimente zur Bestimmung der Stromamplitude durchgeführt. Das neue HCN2-HA Konstrukt erwies sich als voll funktionsfähig (Abbildung 3.22). Das VAPB-Protein in der Konzentration von 1 ng erzielte eine Erhöhung der Oberflächenexpression. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des VAPB-Proteins und VAPA-Proteins (Nishimura et al. 1999) können Hypothesen über eine potentielle Funktionsweise des VAPB-Proteins basierend auf den Forschungsergebnissen des VAPA-Proteins aufgestellt werden. Prosser *et al.* beschrieben das VAPA-Protein als Bindeglied zwischen dem Mikrotubuli-Netzwerk und dem ER. Sie vermuten, dass eine Interaktion mit dem FFAT-Motiv (kloniert aus dem OSBP-Protein/ Lipid-Transfer-Protein) mit der MSP-Domäne des VAPA zu einer Veränderung der Interaktion mit dem Mikrotubuli-Netzwerk führt. Dies könnte zu einer gesteigerten Mobilität von Membranproteinen führen, die sich im ER befinden (Prosser et al. 2008).

Sie postulierten, dass eine Rekrutierung von FFAT Proteinen durch VAPA die Inhibition der lateralen Diffusion durch die Mikrotubuli-Assoziation via VAPA aufheben kann (Prosser et al. 2008).

In den GST-„Pulldown“ Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass sowohl das VAPB-Protein, als auch das VAPA-Protein mit dem HCN2-Kanal direkt interagieren (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.3). Würde die Erhöhung der Stromamplitude lediglich auf einer Interaktion beruhen, welche durch Proteine mit FFAT-Motiven vermittelt wird, sollten auch andere Ionenkanäle bei einer Ko-Expression mit VAPB eine erhöhte Stromamplitude oder Oberflächenexpression aufweisen. In den Experimenten zu Spezifität zeigte sich jedoch, dass die Modulation durch VAPB lediglich auf den HCN1- und HCN2-Kanal beschränkt ist (Abbildung 3.7). Entsprechend ist die Interaktion von VAPB mit dem HCN2-Kanal entscheidend für dessen bevorzugten Transport an die Membran.

4.5.2 Das VAPB-Protein reduziert bei starker Überexpression die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals

Während hohe Mengen in einer verringerten Oberflächenexpression resultieren, führt eine starke Überexpression des VAPB-Proteins vermutlich zu einer Retention des Proteins im ER oder zu einer gesteigerten Endozytose, sodass sich dies in einer geringeren Oberflächenexpression widerspiegelt. Unklar ist, ob eine hohe Konzentration an VAPB zu einer erhöhten Endozytoserate oder zu einer Retention des HCN2-Kanals führt. Einerseits fehlen dem VAPB-Protein ER-Retentionssignale, welche das Protein daran hindern könnten aus dem ER ins Zytoplasma zu gelangen (Stornaiuolo et al. 2003). Allerdings interagiert das VAPB-Protein mit seiner MSP-Domäne mit dem FFAT-Motiv anderer Proteine (Kaiser et al. 2005). Die Interaktion mit dem FFAT-Motiv dient als Signal, Proteine an die zytosolische Membran des ER oder Zellkernmembran zu adressieren (Kaiser et al. 2005), sodass das VAPB-Protein sehr wohl ein Protein ist, welches sich hauptsächlich im ER der Zelle aufhält. Wohingegen eine hohe Konzentration an VAPA oder VAPB zu einer Retention führen könnte, da in diesem Fall eine starke Vernetzung mit dem Mikrotubuli-Netzwerk besteht und die laterale Diffusion gehemmt wird. Soussan *et al.* zeigten, dass ERG30, ein zu VAPA ähnliches Protein, einen Einfluss auf den Transport innerhalb des Golgi-Apparats hat. Antikörper gegen ERG30 führen zu einer Inhibition des Transports innerhalb des Golgi-Apparats. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des VAPA-Proteins zum ERG30-Protein könnte es eine ähnliche Funktion haben. Durch geringe Mengen an VAPA-Protein könnte der Transport zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER gesteigert sein

und dies schlussendlich zu einer gesteigerten Oberflächenexpression des HCN2-Kanals führen. Ist die Menge an VAPA-Protein jedoch zu hoch, könnte dies zu einer Retention führen, da der Transport durch die Überexpression des VAPA-Proteins gestört ist. Entsprechend könnte die Menge an VAPA- oder VAPB-Protein entscheidend für dessen Effekt auf die Oberflächenexpression sein. Während geringe Mengen vermittelt über das FFAT-Motiv den Transport des HCN2-Proteins an die Membran steigern, so könnten hohe Konzentrationen zu einer Retention des Proteins führen.

4.6 Die elektrophysiologischen Eigenschaften der HL-1 Zellen sind abhängig von der funktionellen Expression des VAPB-Proteins

Die HL-1 Zellen sind eine spontan aktive Herzmuskelzelllinie, die in der Lage ist, sich ohne externen Stimulus zu kontrahieren. Sie verfügen über eine endogene HCN-Kanal Expression (Sartiani et al. 2002). Die vorherrschenden Untereinheiten sind HCN1 und HCN2 (Sartiani et al. 2002), die ihrerseits durch das VAPB-Protein moduliert werden. Aber auch die Untereinheiten HCN3 und HCN4 sind in den HL-1 Zellen mittels PCR Analyse nachweisbar (Sartiani et al. 2002).

4.6.1 I_f -Stromeigenschaften sind abhängig von der Menge an VAPB in der Zelle

Eine Überexpression und ein „Knock-Down“ mittels shRNA hatten in HL-1 Zellen wie zu erwarten gegensätzliche Effekte auf den HCN-vermittelten Strom. Eine Überexpression führte, vergleichbar zu den Oozyten-Experimenten, zu einer Tendenz der Vergrößerung der Stromamplitude. Ein „Knock-Down“ führte dagegen tendenziell zu einer Verkleinerung der Stromamplitude des I_f -Stromes. Insbesondere konnte beobachtet werden, dass die Anzahl der HCN-Kanal exprimierenden Zellen durch eine Überexpression an VAPB-Protein zunahm. HL-1 Zellen haben die Besonderheit, dass sie keine gleichmäßige und stabile Proteinexpression innerhalb ihrer Gesamtzellpopulation haben. So weisen lediglich 30% der HL-1 Zellen einen I_f -Strom auf (Sartiani et al. 2002). In den Experimenten zeigte sich, dass die Transfektion von VAPB zu einer Steigerung der HCN-Kanal Häufigkeit auf bis zu 58% im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 38% führt (Abbildung 3.29). Diese Beobachtung lässt die Interpretation zu, dass es durch die Modulation des VAPB-Proteins zu einer Erhöhung der Stromamplitude kommt, sodass der I_f -Strom innerhalb dieser Population häufiger im messbaren Bereich lag. Doch nicht nur die Stromamplitude wurde durch die Menge an VAPB-Protein in der Zelle moduliert, sondern auch die Kinetik der Aktivierung (Abbildung 3.30 und Abbildung 3.31). Als mögliche Ursache könnte die Selektivität des VAPB-Proteins für HCN1 und HCN2 angesehen werden (Abbildung 1.8). Im Falle der Überexpression kommt es zu einer Beschleunigung der Aktivierungskonstanten τ (τ). Durch die Vergrößerung der Stromamplitude des HCN1- und HCN2-Kanals und nicht des HCN4 treten die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser beiden Untereinheiten in den Vordergrund. Sie weisen eine schnellere Aktivierungskinetik auf, als homomere HCN4-Kanäle (Moosmang et al. 2001), was eine Beschleunigung der

Aktivierungskinetik bei einer Überexpression von VAPB erklären würde. Beim „Knock-Down“ mittels shRNA hingegen zeigen sich die elektrophysiologischen Eigenschaften entgegengesetzt zu denen der Überexpression des VAPB-Proteins. Durch die Reduktion der Stromamplituden der HCN1- und HCN2-Untereinheit, kommt der Stromanteil der HCN4-Untereinheit mehr zum Tragen. Sie hat eine deutlich langsamere Kinetik (Moosmang et al. 2001) und trägt damit mehr zur Gesamtkinetik bei als unter physiologischen Bedingungen. Für die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung kann ebenfalls postuliert werden, dass die Modulation auf einer Veränderung der Gewichtung der Untereinheiten basiert. So ist die halbmaximale Aktivierung der HCN4-Untereinheit bei circa -100 mV erreicht, während die der HCN1- und HCN2-Untereinheiten im Bereich von -70 mV und -73 mV liegen (Chen et al. 2000; Stieber et al. 2005). In den Messungen zeigte sich eine Verschiebung des Potentials zu negativeren Spannungen wenn kein VAPB-Protein mehr in den HL-1 Zellen vorhanden war. Dies ist ebenfalls mit dem verstärkten Einfluss der HCN4-Untereinheit zu erklären, da die Vergrößerung der Stromamplituden von HCN1 und HCN2 durch endogenes VAPB der HL-1 Zellen ausblieb.

4.6.2 VAPB moduliert die Schlagfrequenz und die Aktionspotentialdauer von HL-1 Zellen

Die Aktionspotentiale der HL-1 Zellen sind vergleichbar zu denen in Schrittmacherzellen des Sinusknotens. Sie haben, wie die Schrittmacherzellen des Sinusknotens, kein stabiles Ruhemembranpotential (Grant 2009). Die Auszählung der Schlagfrequenz ergab, dass sich durch eine Überexpression die Schlagfrequenz erhöht, während durch einen „Knock-Down“ die Frequenz verlangsamt wird (Abbildung 3.28). Die Messung der Aktionspotentiale sollte zusätzlich verdeutlichen, auf welcher Grundlage sich die Schlagfrequenz verändert. Die Dauer der diastolischen Depolarisation kann als Hauptursache für die Verlangsamung der Frequenz unter „Knock-Down“ Bedingungen angesehen werden. Unter physiologischen Bedingungen wird durch die Aktivierung der HCN-Kanäle während der Hyperpolarisation das Membranpotential zu positiveren Potentialen verschoben (Biel et al. 2009). Ist der Schwellenwert erreicht, wird ein neues Aktionspotential ausgelöst (Craven und Zagotta 2006). Sartiani *et al.* (2000) beschrieben, dass eine klare diastolische Depolarisationsphase ein Merkmal für eine Zellpopulation innerhalb der HL-1 Zellen ist, die den I_f aufweisen. Zellen, die keinen HCN-Strom haben, sind charakterisiert durch einen besonders flachen diastolischen Depolarisationsverlauf (Sartiani et al. 2002). Die Steigung der diastolischen Depolarisation wird maßgeblich durch den I_f -Strom

mitbestimmt (DiFrancesco und Camm 2004). Die gemessenen Aktionspotentiale (Abbildung 3.32) weisen eine steile diastolische Depolarisationsphase auf, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Zellpopulation HCN-Kanäle exprimiert. Ist aufgrund des VAPB „Knock-Downs“ die Stromamplitude verringert, so sollte die Depolarisation der Membran verlangsamt und die Dauer der diastolischen Depolarisation, bis der Schwellenwert für ein neues Aktionspotential erreicht wird, signifikant verlängert sein. Diese Hypothese konnte durch die Messungen der HL-1 Zellen bestätigt werden (Abbildung 3.34). Der Schwellenwert für die Auslösung eines Aktionspotentials und dessen maximales diastolisches Potential waren hierbei unverändert. Das maximale diastolische Potential wird indirekt über den HCN-Kanal gesteuert. Während des Aktionspotentials schließen die HCN-Kanäle aufgrund des positiven Membranpotentials (DiFrancesco 2006). DiFrancesco (2006) beschrieb, dass diese Kanäle sich während der späten Repolarisation (-40 mV) öffnen und den Kaliumstrom (I_K) antagonisieren bis das maximale diastolische Potential (MDP) erreicht wird. Zu diesem Zeitpunkt sind die Kaliumkanäle der Repolarisation geschlossen und die Membran wird nach Erreichen des MDPs bis zum Schwellenwert für ein neues Aktionspotential depolarisiert (DiFrancesco 2006). Dass das maximale diastolische Potential unverändert blieb, könnte auf die dominante Expression des HCN4-Kanal zurückzuführen sein (Shi et al. 1999). Dieser ist durch das VAPB-Protein nicht moduliert (Kapitel 1.4.2). Der Schwellenwert für ein neues Aktionspotential wird neben den HCN-Kanälen zusätzlich durch die Aktivierung von T-Typ Kalziumkanälen reguliert (Doerr, Denger und Trautwein 1989). Somit kann eine Modulation durch T-Typ Kalziumkanäle derzeit nicht ausgeschlossen werden und es müssen weitere Patch-Clamp Experimente in Bezug auf Kalziumkanäle durchgeführt werden. Bei den Messungen in HL-1 Zellen zeigte sich, dass die diastolische Depolarisation unter VAPB „Knock-Down“-Bedingungen langsamer und flacher verläuft (Abbildung 3.34). In diesem Fall könnte die diastolische Depolarisation durch T-Typ Kalziumkanäle, sowie die VAPB-unempfindliche HCN4-Untereinheit getragen werden. Sallé *et al.* postulierten, dass bei einer niedrigen Schlagfrequenz Aktionspotentiale länger sind, als bei einer hohen Frequenz. Ursache hierfür ist die hohe Kaliumleitfähigkeit gegen Ende eines Aktionspotentials, die auch nach Abklingen des Aktionspotentials noch einige Zeit vorhanden ist (Sallé et al. 2008). Folgt aufgrund der schnellen Frequenz direkt ein neues Aktionspotential, ist dessen Repolarisationsphase verkürzt und das Aktionspotential wird in seiner Gesamtlänge kürzer (Sallé et al. 2008). Das bedeutet im Gegenzug, wenn durch eine verminderte HCN-Kanal Aktivität die diastolische Depolarisation in ihrer Dauer verlängert ist, dass die Frequenz erniedrigt ist und die Aktionspotentialdauer zunimmt. Dass sich die Aktionspotentialfrequenz aufgrund einer

Modulation des HCN-Stroms tatsächlich reduziert, konnte durch die Gabe eines HCN-Kanal Blockers gezeigt werden. Die Studie von Yang *et. al* (2011) hat gezeigt, dass durch die Gabe von Ivabradin die Aktionspotentialanzahl verringert wird. Dies unterstützt die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse und zeigt, dass der HCN-Kanal einen wesentlichen Beitrag zur Frequenzmodulation beiträgt und das VAPB-Protein einen wesentlich Beitrag zu dieser Modulation leistet.

4.7 Bradykardie in VAPB „Knock-Out“-Mäusen

Die „Knock-Out“-Tiere wurden in verschiedenen Experimenten eingesetzt. Zur Bestimmung des kardialen Phänotyps wurden „Tail Cuff“ und EKG Messungen durchgeführt.

Die „Tail Cuff“ Messungen basieren auf einer nicht invasiven Methode, um sowohl die Herzfrequenz als auch den Blutdruck zu ermitteln. Hierzu werden die Tiere in eine Apparatur eingespannt und ein Sensor am Schwanz befestigt. Die aufgezeichneten Daten zeigten, dass die VAPB „Knock-Out“-Tiere keine Veränderungen des Blutdrucks aufweisen, jedoch eine verlangsamte Herzschlagrate gegenüber ihren Wildtyp-Geschwistertieren (Abbildung 3.35). Die physiologischen Grundlagen, die hierfür zugrunde liegen, können allerdings mit dieser Methode nicht ermittelt werden. Entsprechend waren die nachfolgenden EKG Messungen notwendig, um Aussagen über die physiologischen Prozesse zu treffen.

Die VAPB^{-/-} Tiere hatten, unabhängig von ihrem Alter, sowohl im wachen als auch im sedierten Zustand, eine verlangsamte Herzfrequenz (Abbildung 3.36). Diese Sinusbradykardie zeigte sich durch eine verlängerte QT Zeit, während der QRS Komplex unverändert blieb. Dies führt zu einem verlängerten RR-Intervall und damit zu einer verlangsamten Herzfrequenz. Während das PQ Intervall die Dauer des Aktionspotentials und Erregungsüberleitung im Vorhof darstellt (Keller et al. 1978), ist die QT Zeit des EKGs die Dauer des ablaufenden Aktionspotentials im Ventrikel und dessen Repolarisation (Kautzner 2002). Sie wird vom Beginn des QRS-Komplexes bis zum Ende der T-Welle gemessen (Scott und Walls 1985). Als Ursache für die Verlängerung der QT Zeit kann ein Verlust oder Reduktion des I_f -Stroms durch die HCN-Kanäle gesehen werden. Wie zuvor erwähnt, moduliert die Herzschlagfrequenz die Aktionspotentialdauer. Durch die Schrittmacherfunktion wird die Herzschlagfrequenz durch die Dauer der diastolischen Depolarisation im Sinusknoten vorgegeben und per Erregungsübertragung an das Myokard weiter gegeben (DiFrancesco und Camm 2004). Indirekt beeinflusst der Strom durch die HCN-Kanäle

also auch die Aktionspotentialhäufigkeit im Kammermyokard. Das VAPB-Protein hat also durch seinen Einfluss auf die Stromamplitude des HCN1- und HCN2-Kanals einen wesentlichen Einfluss auf die Dauer und Steilheit der diastolischen Depolarisation und somit auch die Aktionspotentialhäufigkeit. Nach Scott und Walls (1985) ist die Länge des QT-Intervalls invers frequenzmoduliert. Die Ursache liegt in der beschleunigten Repolarisation von Aktionspotentialen bei hohen Frequenzen (Sallé et al. 2008). Die Erregung des Ventrikels unterscheidet sich hierbei vom Aktionspotential der Schrittmacherzellen (Grant 2009). So ist das Aktionspotential des Herzmyokards durch eine schnelle Depolarisation der Membran mittels eines Natriumeinstroms (SCN5A) gekennzeichnet (Darbar et al. 2008). Die Plateauphase des Aktionspotentials entsteht durch ein Öffnen von L-Typ Kalziumkanälen (Trautwein und Hescheler 1990) und wird durch die Repolarisation mittels eines Kaliumausstroms durch verschiedene Kaliumkanäle abgelöst (Roden et al. 2002).

Die Expression der HCN-Kanal Untereinheiten ist jedoch nicht nur auf den Sinusknoten in den Schrittmacherzellen beschränkt. HCN-Kanäle sind ebenfalls in den ventrikulären Myozyten des Kammermyokards exprimiert (Hofmann et al. 2012). Bevorzugt exprimiert sind in diesem Gewebe die HCN2- und HCN4-Untereinheit (Cerbai und Mugelli 2006). HCN-Kanäle sind während des Ruhemembranpotentials der ventrikulären Kardiomyozyten geöffnet. Fenske *et al.* postulierten, dass ein aktives Öffnen der HCN-Kanäle zum Zeitpunkt des Aktionspotentials aufgrund ihrer Eigenschaft bei Hyperpolarisation zu öffnen, nicht gegeben ist. Jedoch sind sie während der gesamten Zeitverlaufs des Aktionspotentials aufgrund ihrer langsamen Deaktivierungskinetik geöffnet (Fenske et al. 2011). Eine Hochregulation des HCN-Stroms führt zu einer deutlichen Verlängerung der Dauer des Aktionspotentials (Stillitano et al. 2008). In Einklang mit diesen Erkenntnissen zeigte sich in HCN3^{-/-} „Knock-Out“-Mäusen eine Verkürzung der Aktionspotentialdauer in epikardialen Myozyten durch eine beschleunigte späte Repolarisation (Fenske et al. 2011). HCN-Kanäle wirken als Antagonisten zu den repolarisierenden Kaliumströmen und somit insbesondere die Dauer der Repolarisation verlangsamen (Fenske et al. 2011). Ob die VAPB^{-/-}-Mäuse ebenfalls über eine beschleunigte späte Repolarisation verfügen, müssten Patch-Clamp Messungen der ventrikulären Aktionspotentiale durchgeführt werden. Die EKG-Messungen der HCN3 „Knock-Out“-Mäuse zeigten Übereinstimmungen mit den Messungen der VAPB „Knock-Out“-Mäuse. Fenske *et al.* (2011) beschrieben, dass insbesondere die Morphologie der T-Welle im Falle der HCN3^{-/-}-Mäuse bei niedrigen Herzfrequenzen verändert vorlag, da sich die Amplitude der T-Welle erhöhte. Die VAPB^{-/-}-Tiere zeigten ebenfalls eine veränderte Morphologie der T-

Welle einhergehend mit einer Amplitudenerhöhung (Abbildung 3.36). Im Falle der VAPB „Knock-Out“-Mäuse war dieser Effekt, im Vergleich zu den HCN3^{-/-} „Knock-Out“-Mäusen, jedoch nicht frequenzabhängig. Die T-Welle entsteht durch die transmurale Ausbreitung der Erregung im Myokard (Yan et al. 2003). Die Erregungsrückbildung findet ausgehend vom Epikard zum Endokard statt und ist daher zeitlich versetzt (Yan et al. 2003). Die Erhöhung der Amplitude ist auf eine veränderte Repolarisationsdauer in den epi- oder endokardialen Myozyten zurückzuführen (Fenske et al. 2011). Aufgrund der zeitlich versetzten Erregungsausbreitung kommt es zu einer Vergrößerung des Spannungsunterschieds zwischen den endo- und epikardialen Zellen mit der Folge einer erhöhten T-Welle (Yan und Antzelevitch 1998). In den HCN3 „Knock-Out“-Mäusen zeigte sich neben der beschleunigten Repolarisation und veränderten Morphologie der T-Welle auch eine Verlängerung der QT-Zeit (12%, Fenske et al. 2011). Die QT-Strecke stellt die Zeit der Repolarisation dar, wobei die T-Welle den Teil der späten kardialen Repolarisation repräsentiert. Die VAPB „Knock-Out“-Mäuse zeigten ein ähnliches Bild in Form eines „Long-QT“ Syndroms (LQT). Bei einer unveränderten QRS-Komplex-Dauer wiesen die Tiere eine Verlängerung der QT-Zeit von circa 16% auf. In der Literatur sind verschiedene Typen an LQT Syndromen beschrieben, die auf einer verlängerten Repolarisation beruhen. Verschiedene Unterformen werden durch unterschiedliche Ionenkanäle mittels eines „Loss of function“ oder „Gain of function“ des entsprechenden Kanals ausgelöst. So können der SCN5A (Natriumkanal, Aufstrich des Aktionspotentials, „Gain of function“) oder auch die an der Repolarisation beteiligten KCNQ1-Kanäle („Loss of function“) für die Ausbildung eines solchen Syndroms verantwortlich sein (Modell und Lehmann 2006). Ein LQT Syndrom zeichnet sich durch die Verlängerung der QT-Zeit im EKG aus und führt zu Störungen der kardialen Signalweiterleitung mit der Folge von Arrhythmien (Moss and Kass 2005). Somit könnte die fehlende Modulation des HCN-Kanals durch das VAPP-Protein in diesem Zusammenhang zu einem LQT Syndrom führen. Der HCN-Kanal wurde hierdurch erstmalig mit dieser Krankheit in Verbindung gebracht, gleichermaßen wie das VAPB-Protein zum ersten Mal mit der Regulation der Herzfrequenz beschrieben wurde. Es könnte somit einen wesentlichen Beitrag zu der Entstehung von Sinusbradykardien und Herzrhythmusstörungen leisten und ein mögliches Zielprotein für neue Therapieansätze darstellen.

4.8 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigten die modulatorischen Fähigkeiten des VAPB-Proteins auf den HCN1- und HCN2-Kanal. Insbesondere die physiologische Relevanz in Bezug auf die Herzfunktion konnten dargestellt werden (Kapitel 3.6 und 3.7). So konnte gezeigt werden, dass eine fehlende Interaktion mit dem VAPB-Protein zu einer Bradykardie führt und das VAPB-Protein als zukünftiges Zielprotein für die Behandlung von Herzrhythmusstörungen in Frage kommt.

Einige Aspekte der VAPB-Interaktion sollten dennoch weiter erforscht werden, insbesondere um den Mechanismus der Interaktion zu definieren und so die Basis für mögliche Behandlungsmethoden zu gewährleisten. Das VAPB-Protein interagiert vermutlich mittels VAPA mit dem HCN2-Kanal (Kapitel 3.2.7) oder liegt in einem Komplex mit den Proteinen VAPA, VAMP1 und VAMP2 vor. Dass das VAPB-Protein mit sich selbst oder dem VAPA-Protein interagieren kann, wurde bereits 2008 durch Lev *et al.* beschrieben. Um zu untersuchen, ob eine Dimerisierung essentiell für die Modulation der elektrophysiologischen Eigenschaften des HCN2-Kanals ist, könnte das Dimerisierungsmotiv (LXXXL) in der Transmembrandomäne des VAPB-Proteins mutiert werden. Durch ein „Pulldown“-Experiment könnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine Interaktion mit dem VAPA Protein die Interaktion mit dem HCN2-Kanal unterstützt. Hierzu müsste ein Pulldown mit GST-VAPB und *in vitro* translatiertem HCN2-Protein, sowie VAPA-Protein durchgeführt werden. Bei einer Interaktion des GST-VAPB mit dem VAPA-Protein sollte ein im Western Blot stärkeres Signal detektierbar sein, als mit dem GST-VAPB-Protein allein.

Ein „Knock-Out“ des HCN3-Kanals in Mäusen weist einen zur VAPB „Knock-Out“-Maus vergleichbaren kardialen Phänotyp auf und ist daher von großem Interesse. In dieser Arbeit wurden die HCN-Familienmitglieder HCN1, HCN2 und HCN4 auf eine Modulation durch das VAPB-Protein untersucht, jedoch nicht der HCN3-Kanal. Weitere Studien sollten daher eine mögliche Modulation des HCN3-Kanals durch das VAPB-Protein bestimmen.

In den Experimenten zur Analyse der Oberflächenexpression in Oozyten zeigte sich, dass eine hohe Menge an VAPB sowohl die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals verringert (Kapitel 3.5) als auch dass die Stromamplitude verringert wird (Kapitel 1.4.2). Die Ursache für diese Beobachtung ist derzeit unklar, da es sich entweder um einen Effekt der vermehrten Endozytose (vermittelt über Proteine innerhalb des Komplexes) handeln könnte oder der Retention (vermittelt über das FFAT-Motiv). Hierzu könnten in Oozyten Oberflächenexpressionsassays oder TEVC-Messungen unter der

Verwendung des Endozytose Blockers Dynasore durchgeführt werden. Sind die verringerte Stromamplitude und Oberflächenexpression auf einen Endozytose-Effekt zurückzuführen, so sollte das Dynasore diese unterbinden und keine Veränderung mehr zu beobachten sein. Gleiches könnte auch in Oberflächenassays unter der Verwendung von HeLa-Zellen durchgeführt werden. Die Oberflächenexpression sollte bei einer Modulation vermittelt über Endozytose ansteigen.

Insbesondere in Bezug auf die klinische Relevanz der VAPB-P56S Mutation und die amyotrophe Lateralsklerose sind weitere Fragen offen. Eventuell könnte auch die Modulation des HCN2-Kanals zum Phänotyp der ALS beitragen, da das HCN-Protein nachweislich in Motoneuronen exprimiert ist (Chen et al. 2005). Außerdem wäre es von großem Interesse, welche Auswirkungen die Modulation des HCN-Kanals auf die Aktivitäten in einzelnen Gehirnregionen hat. Hierzu könnten „Patch-Clamp“-Experimente von VAPB „Knock-Out“-Tieren wesentliche Erkenntnisse liefern.

5 Literaturverzeichnis

- Aliaga et al. 2013. "Amyotrophic Lateral Sclerosis-Related VAPB P56S Mutation Differentially Affects the Function and Survival of Corticospinal and Spinal Motor Neurons." *Human Molecular Genetics* 22(21):4293–4305.
- Altomare et al. 2003. "Heteromeric HCN1-HCN4 Channels: A Comparison with Native Pacemaker Channels from the Rabbit Sinoatrial Node." *The Journal of physiology* 549(Pt 2):347–59.
- Amarilio et al. 2005. "Differential Regulation of Endoplasmic Reticulum Structure through VAP-Nir Protein Interaction." *Journal of Biological Chemistry* 280(7):5934–44.
- Baird, Zacharias und Tsien 2000. "Biochemistry, Mutagenesis, and Oligomerization of DsRed, a Red Fluorescent Protein from Coral." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(22):11984–89.
- Baylor, Matthews und Nunn 1984. "Location and Function of Voltage-Sensitive Conductances in Retinal Rods of the Salamander, *Ambystoma Tigrinum*." *The Journal of physiology* 354:203–23.
- Beaumont und Zucker 2000. "Enhancement of Synaptic Transmission by Cyclic AMP Modulation of Presynaptic Ih Channels." *Nature neuroscience* 3(2):133–41.
- Biel et al. 2009. "Hyperpolarization-Activated Cation Channels: From Genes to Function." *Physiological reviews* 89(3):847–85.
- BoSmith Briggs und Sturgess 1993. "Inhibitory Actions of ZENECA ZD7288 on Whole-Cell Hyperpolarization Activated Inward Current (I_h) in Guinea-Pig Dissociated Sinoatrial Node Cells." *British journal of pharmacology* 110(1):343–49.
- Brückner et al. 2009. "Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology." *International Journal of Molecular Sciences* 10(6):2763–88.
- Catterall 1995. "Structure and Function of Voltage-Gated Ion Channels." *Annual review of biochemistry* 64:493–531.
- Cerbai und Mugelli 2006. "I_h in Non-Pacemaker Cells: Role and Pharmacological Implications." *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 53(5):416–23. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713285>).
- Cha et al. 2011. "The Roles of Maternal Vangl2 and aPKC in *Xenopus* Oocyte and Embryo Patterning." *Development (Cambridge, England)* 138(18):3989–4000.
- Chen et al. 2010. "Characterization of the Properties of a Novel Mutation in VAPB in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis." *The Journal of biological chemistry* 285(51):40266–81.
- Chen et al. 2000. "Functional Roles of Charged Residues in the Putative Voltage Sensor of the HCN2 Pacemaker Channel." *Journal of Biological Chemistry* 275(46):36465–71.

- Chen et al. 2005. "HCN Subunit-Specific and cAMP-Modulated Effects of Anesthetics on Neuronal Pacemaker Currents." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25(24):5803–14.
- Cheng et al. 2007. "Molecular Mapping of the Binding Site for a Blocker of Hyperpolarization-Activated, Cyclic Nucleotide-Modulated Pacemaker Channels." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 322(3):931–39.
- Craven und Zagotta 2006. "CNG and HCN Channels: Two Peas, One Pod." *Annual review of physiology* 68:375–401.
- Darbar et al. 2008. "Cardiac Sodium Channel (SCN5A) Variants Associated with Atrial Fibrillation." *Circulation* 117(15):1927–35.
- Decher et al. 2003. "KCNE2 Modulates Current Amplitudes and Activation Kinetics of HCN4: Influence of KCNE Family Members on HCN4 Currents." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 446(6):633–40.
- DiFrancesco 1993. "Pacemaker Mechanisms in Cardiac Tissue." *Annual review of physiology* 55:455–72.
- DiFrancesco 1982. "Block and Activation of the Pace-Maker Channel in Calf Purkinje Fibres: Effects of Potassium, Caesium and Rubidium." *The Journal of physiology* 329:485–507.
- DiFrancesco und Tortora 1991. "Direct Activation of Cardiac Pacemaker Channels by Intracellular Cyclic AMP." *Nature* 351(6322):145–47.
- DiFrancesco Dario 2006. "Funny Channels in the Control of Cardiac Rhythm and Mode of Action of Selective Blockers." *Pharmacological Research* 53(5):399–406.
- DiFrancesco 2010. "The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity." *Circulation Research* 106(3):434–46.
- DiFrancesco und Camm 2004. "Heart Rate Lowering by Specific and Selective If Current Inhibition with Ivabradine: A New Therapeutic Perspective in Cardiovascular Disease." *Drugs* 64(16):1757–65.
- DiFrancesco und Mangoni 1994. "Modulation of Single Hyperpolarization-Activated Channels (if) by cAMP in the Rabbit Sino-Atrial Node." *Journal of Physiology* 474(3):473–82.
- Doerr, Denger und Trautwein 1989. "Calcium Currents in Single SA Nodal Cells of the Rabbit Heart Studied with Action Potential Clamp." *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 413(6):599–603.
- Doyle et al. 1998. "The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity." *Science (New York, N.Y.)* 280(5360):69–77.
- Fain und Bastian 1978. "Contribution of a Caesium-Sensitive Conductance Increase to the Rod Photoresponse." *Nature* 272:467–69.
- Fenske et al. 2011. "HCN3 Contributes to the Ventricular Action Potential Waveform in the Murine Heart." *Circulation Research* 109(9):1015–23.
- Fenske et al 2011. "The Role of HCN Channels in Ventricular Repolarization." *Trends in Cardiovascular Medicine* 21(8):216–20.

- Forrest et al. 2013. "Increased Levels of Phosphoinositides Cause Neurodegeneration in a Drosophila Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Human Molecular Genetics* 22(13):2689–2704.
- Foster et al. 2000. "A Functional Role for VAP-33 in Insulin-Stimulated GLUT4 Traffic." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 1(6):512–21.
- Frace, Maruoka und Noma 1992. "External K⁺ Increases Na⁺ Conductance of the Hyperpolarization-Activated Current in Rabbit Cardiac Pacemaker Cells." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 421(1):94–96.
- Furst et al. 2003. "Electron Cryomicroscopy Structure of N-Ethyl Maleimide Sensitive Factor at 11 ?? Resolution." *EMBO Journal* 22(17):4365–74.
- Goethals, Raes und van Bogaert 1993. "Use-Dependent Block of the Pacemaker Current I(f) in Rabbit Sinoatrial Node Cells by Zatebradine (UL-FS 49). On the Mode of Action of Sinus Node Inhibitors." *Circulation* 88(5 Pt 1):2389–2401.
- Grant 2009. "Cardiac Ion Channels." *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 2(2):185–94.
- Halliwel und Adams 1982. "Voltage-Clamp Analysis of Muscarinic Excitation in Hippocampal Neurons." *Brain Research* 250(1):71–92.
- Han et al. 2011. "Trafficking and Gating of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels Are Regulated by Interaction with Tetratricopeptide Repeat-Containing Rab8b-Interacting Protein (TRIP8b) and Cyclic AMP at Distinct Sites." *The Journal of biological chemistry* 286(23):20823–34.
- Hardel et al. 2008. "Recycling Endosomes Supply Cardiac Pacemaker Channels for Regulated Surface Expression." *Cardiovascular Research* 79(1):52–60.
- Harris und Constanti 1995. "Mechanism of Block by ZD 7288 of the Hyperpolarization-Activated Inward Rectifying Current in Guinea Pig Substantia Nigra Neurons in Vitro." *Journal of neurophysiology* 74(6):2366–78.
- Herrmann, S., F. Hofmann, J. Stieber, and a Ludwig. 2011. "HCN Channels in the Heart: Lessons from Mouse Mutants." *British journal of pharmacology*.
- Herrmann, Stieber und Ludwig 2007. "Pathophysiology of HCN Channels." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 454(4):517–22.
- Hille 1978. "Ionic Channels in Excitable Membranes." *Biophysical Journal* 22(February 1977):283–94.
- Ho et al. 1994. "High Selectivity of the If Channel to Na⁺ and K⁺ in Rabbit Isolated Sinoatrial Node Cells." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 426(1-2):68–74.
- Hofmann et al. 2012. "Ventricular HCN Channels Decrease the Repolarization Reserve in the Hypertrophic Heart." *Cardiovascular Research* 95(3):317–26.
- Hu et al. 2013. "Binding of the Auxiliary Subunit TRIP8b to HCN Channels Shifts the Mode of Action of cAMP." *The Journal of general physiology* 142(6):599–612.
- Isenmann et al. 1998. "A Splice-Isoform of Vesicle-Associated Membrane Protein-1 (VAMP-1) Contains a Mitochondrial Targeting Signal." *Molecular biology of the cell* 9(7):1649–60.

- Ishii et al. 1999. "Molecular Characterization of the Hyperpolarization-Activated Cation Channel in Rabbit Heart Sinoatrial Node." *Journal of Biological Chemistry* 274(18):12835–39.
- Jeon, Strettoi und Masland 1998. "The Major Cell Populations of the Mouse Retina." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(21):8936–46.
- Kabashi et al. 2013. "Investigating the Contribution of VAPB/ALS8 Loss of Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Human Molecular Genetics* 22(12):2350–60.
- Kaiser et al. 2005. "Structural Basis of FFAT Motif-Mediated ER Targeting." *Structure* 13(7):1035–45.
- Kanekura et al. 2006. "Characterization of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Linked P56S Mutation of Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein B (VAPB/ALS8)." *Journal of Biological Chemistry* 281(40):30223–33.
- Kaupp, U. Benjamin and Reinhard Seifert. 2002. "Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels." *Physiol Rev* 82(3):769–824.
- Kautzner 2002. "QT Interval Measurements." *Cardiac Electrophysiology Review* 6(3):273–77.
- Keller et al. 1978. "Correlation between Serum Concentration and Pharmacological Effect on Atrioventricular Conduction Time of the Antiarrhythmic Drug Propafenone." *European journal of clinical pharmacology* 13(1):17–20.
- Kiernan et al. 2011. "Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Lancet* 377(9769):942–55.
- Kimura et al. 2004. "Hyperpolarization-Activated, Cyclic Nucleotide-Gated HCN2 Cation Channel Forms a Protein Assembly with Multiple Neuronal Scaffold Proteins in Distinct Modes of Protein-Protein Interaction." *Genes to Cells* 9:631–40.
- Klein et al. 2002. "Genetic and Genomic Tools for Xenopus Research: The NIH Xenopus Initiative." *Developmental Dynamics* 225(4):384–91.
- Knecht et al. 1995. "Dorsal-Ventral Patterning and Differentiation of Noggin-Induced Neural Tissue in the Absence of Mesoderm." *Development (Cambridge, England)* 121(6):1927–35.
- Kuijpers et al. 2013. "Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)-Associated VAPB-P56S Inclusions Represent an ER Quality Control Compartment." *Acta neuropathologica communications* 1(1):24.
- Kuijpers et al. 2013. "The ALS8 Protein VAPB Interacts with the ER-Golgi Recycling Protein YIF1A and Regulates Membrane Delivery into Dendrites." *The EMBO journal* 32(14):2056–72.
- Lev et al. 2008. "The VAP Protein Family: From Cellular Functions to Motor Neuron Disease." *Trends in Cell Biology* 18(6):282–90.
- Lillie und Kobinger 1987. "Investigations Differentiating the Mechanism of Specific Bradycardic Agents from that of Calcium Channel Blockers." *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 335(3):331–33.

- Lillie und Kobinger 1984. "Decrease in Bradycardic Effect of AQ-A 39 and Alinidine in Guinea-Pig Sinoatrial Node Depolarized by High External K⁺-Concentration." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 328(2):210–13.
- Ludwig et al. 2003. "Absence Epilepsy and Sinus Dysrhythmia in Mice Lacking the Pacemaker Channel HCN2." *EMBO Journal* 22(2):216–24.
- Ludwig et al. 1998. "A Family of Hyperpolarization-Activated Mammalian Cation Channels." *Nature* 393(6685):587–91.
- Lvov et al. 2008. "VAMP2 Interacts Directly with the N Terminus of Kv2.1 to Enhance Channel Inactivation." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 456(6):1121–36.
- Macri et al. 2002. "Separable Gating Mechanisms in a Mammalian Pacemaker Channel." *Journal of Biological Chemistry* 277(39):35939–46.
- Maller, Butcher und Krebs. 1979. "Early Effect of Progesterone on Levels of Cyclic Adenosine 3':5'-Monophosphate in *Xenopus* Oocytes." *The Journal of biological chemistry* 254(3):579–82.
- Milanesi et al. 2006. "Familial Sinus Bradycardia Associated with a Mutation in the Cardiac Pacemaker Channel." *The New England journal of medicine* 354(2):151–57.
- Mitchell und Borasio. 2007. "Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Lancet* 369(9578):2031–41.
- Mitne-Neto et al. 2007. "A Mutation in Human VAP-B-MSP Domain, Present in ALS Patients, Affects the Interaction with Other Cellular Proteins." *Protein Expression and Purification* 55(1):139–46.
- Monteggia et al. 2000. "Cloning and Localization of the Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channel Family in Rat Brain." *Molecular Brain Research* 81(1-2):129–39.
- Moosmang et al. 1999. "Differential Distribution of Four Hyperpolarization-Activated Cation Channels in Mouse Brain." *Biological Chemistry* 380(7-8).
- Moosmang et al. 2001. "Cellular Expression and Functional Characterization of Four Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channels in Cardiac and Neuronal Tissues." *European Journal of Biochemistry* 268(6):1646–52.
- Moroni et al. 2000. "Kinetic and Ionic Properties of the Human HCN2 Pacemaker Channel." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 439(5):618–26.
- Moss und Kass 2005. "Long QT Syndrome: From Channels to Cardiac Arrhythmias." *The Journal of clinical investigation* 115(8):2018–24.
- Much et al. 2003. "Role of Subunit Heteromerization and N-Linked Glycosylation in the Formation of Functional Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels." *Journal of Biological Chemistry* 278(44):43781–86.
- Netter et al. 2012. "The HCN4 Channel Mutation D553N Associated with Bradycardia Has a C-Linker Mediated Gating Defect." *Cellular Physiology and Biochemistry* 30(5):1227–40.

- Nishimura et al. 2004. "A Mutation in the Vesicle-Trafficking Protein VAPB Causes Late-Onset Spinal Muscular Atrophy and Amyotrophic Lateral Sclerosis." *American journal of human genetics* 75(5):822–31.
- Nishimura et al. 1999. "Molecular Cloning and Characterization of Mammalian Homologues of Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated (VAMP-Associated) Proteins." *Biochemical and biophysical research communications* 254(1):21–26.
- Nof et al. 2007. "Point Mutation in the HCN4 Cardiac Ion Channel Pore Affecting Synthesis, Trafficking, and Functional Expression Is Associated with Familial Asymptomatic Sinus Bradycardia." *Circulation* 116(5):463–70.
- Nolan et al. 2004. "A Behavioral Role for Dendritic Integration: HCN1 Channels Constrain Spatial Memory and Plasticity at Inputs to Distal Dendrites of CA1 Pyramidal Neurons." *Cell* 119(5):719–32.
- Nolan et al. 2003. "The Hyperpolarization-Activated HCN1 Channel Is Important for Motor Learning and Neuronal Integration by Cerebellar Purkinje Cells." *Cell* 115(5):551–64.
- Ophthof et al. 1986. "Electrophysiological Effects of Alinidine (ST 567) on Sinoatrial Node Fibres in the Rabbit Heart." *Cardiovascular research* 20(10):727–39.
- Pape und McCormick 1989. "Noradrenaline and Serotonin Selectively Modulate Thalamic Burst Firing by Enhancing a Hyperpolarization-Activated Cation Current." *Nature* 340(6236):715–18.
- Pennetta et al. 2002. "Drosophila VAP-33A Directs Bouton Formation at Neuromuscular Junctions in a Dosage-Dependent Manner." *Neuron* 35(2):291–306.
- Peretti et al. 2008. "Coordinated Lipid Transfer between the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Complex Requires the VAP Proteins and Is Essential for Golgi-Mediated Transport." *Molecular biology of the cell* 19(9):3871–84.
- Prosser et al. 2008. "FFAT Rescues VAPA-Mediated Inhibition of ER-to-Golgi Transport and VAPB-Mediated ER Aggregation." *Journal of cell science* 121(Pt 18):3052–61.
- Raes et al. 1998. "Use-Dependent Block of Ih in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons by Sinus Node Inhibitors." *British journal of pharmacology* 125(4):741–50.
- Roden et al. 2002. "Cardiac Ion Channels." *Annual review of physiology* 64:431–75.
- Sallé et al. 2008. "Mechanisms Underlying Adaptation of Action Potential Duration by Pacing Rate in Rat Myocytes." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 96(1-3):305–20.
- Sampo et al. 2003. "Two Distinct Mechanisms Target Membrane Proteins to the Axonal Surface." *Neuron* 37(4):611–24.
- Santoro et al. 1998. "Identification of a Gene Encoding a Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channel of Brain." *Cell* 93(5):717–29.

- Santoro, Wainger und Siegelbaum 2004. "Regulation of HCN Channel Surface Expression by a Novel C-Terminal Protein-Protein Interaction." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 24(47):10750–62.
- Santoro et al. 2009. "TRIP8b Splice Variants Form a Family of Auxiliary Subunits That Regulate Gating and Trafficking of HCN Channels in the Brain." *Neuron* 62(6):802–13.
- Sartiani et al. 2002. "Functional Expression of the Hyperpolarization-Activated, Non-Selective Cation Current I(f) in Immortalized HL-1 Cardiomyocytes." *The Journal of physiology* 545(Pt 1):81–92.
- Schoch et al. 2001. "SNARE Function Analyzed in synaptobrevin/VAMP Knockout Mice." *Science (New York, N.Y.)* 294(5544):1117–22.
- Schulze-Bahr et al. 2003. "Pacemaker Channel Dysfunction in a Patient with Sinus Node Disease." *Journal of Clinical Investigation* 111(10):1537–45.
- Scott und Walls 1985. "QT Interval Prolongation." *J.Emerg.Med.* 3(0736-4679 (Print)):221–25.
- Shi et al. 1999. "Distribution and Prevalence of Hyperpolarization-Activated Cation Channel (HCN) mRNA Expression in Cardiac Tissues." *Circulation research* 85(1):e1–6.
- Skehel und Kandel 2000. "Mouse VAP33 Is Associated with the Endoplasmic Reticulum and Microtubules." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(3):1101–6.
- Skehel et al. 1995. "A VAMP-Binding Protein from Aplysia Required for Neurotransmitter Release." *Science (New York, N.Y.)* 269(5230):1580–83.
- Stagljar et al. 1998. "A Genetic System Based on Split-Ubiquitin for the Analysis of Interactions between Membrane Proteins in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(9):5187–92.
- Stieber et al. 2003. "The Hyperpolarization-Activated Channel HCN4 Is Required for the Generation of Pacemaker Action Potentials in the Embryonic Heart." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(25):15235–40.
- Stieber et al. 2005. "Functional Expression of the Human HCN3 Channel." *Journal of Biological Chemistry* 280(41):34635–43.
- Stieber et al. 2006. "Bradycardic and Proarrhythmic Properties of Sinus Node Inhibitors." *Molecular pharmacology* 69(4):1328–37.
- Stillitano et al. 2008. "Molecular Basis of Funny Current (If) in Normal and Failing Human Heart." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45(2):289–99.
- Stornaiuolo et al. 2003. "KDEL and KKXX Retrieval Signals Appended to the Same Reporter Protein Determine Different Trafficking between Endoplasmic Reticulum, Intermediate Compartment, and Golgi Complex." *Molecular biology of the cell* 14(3):889–902.

- Teuling et al. 2007. "Motor Neuron Disease-Associated Mutant Vesicle-Associated Membrane Protein-Associated Protein (VAP) B Recruits Wild-Type VAPs into Endoplasmic Reticulum-Derived Tubular Aggregates." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27(36):9801–15.
- Trautwein und Hescheler 1990. "Regulation of Cardiac L-Type Calcium Current by Phosphorylation and G Proteins." *Annual review of physiology* 52:257–74.
- Tristani-Firouzi und Etheridge 2010. "Kir 2.1 Channelopathies: The Andersen-Tawil Syndrome." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 460(2):289–94.
- Ueda et al. 2004. "Functional Characterization of a Trafficking-Defective HCN4 Mutation, D553N, Associated with Cardiac Arrhythmia." *Journal of Biological Chemistry* 279(26):27194–98.
- Uhlén et al. 2015. "Tissue-Based Map of the Human Proteome." *Science* 347 (6220).
- Viscomi et al. 2001. "C Terminus-Mediated Control of Voltage and cAMP Gating of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels." *Journal of Biological Chemistry* 276(32):29930–34.
- Walecki 2011. "Identifizierung Und Funktionelle Charakterisierung Eines Neuen HCN2-Interaktionsproteins." Universität Marburg.
- Weimbs et al. 1997. "A Conserved Domain Is Present in Different Families of Vesicular Fusion Proteins: A New Superfamily." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(7):3046–51.
- Weir et al. 1998. "Identification of a Human Homologue of the Vesicle-Associated Membrane Protein (VAMP)-Associated Protein of 33 kDa (VAP-33): A Broadly Expressed Protein That Binds to VAMP." *The Biochemical journal* 333 (Pt 2:247–51.
- Weir et al. 2001. "VAP-A Binds Promiscuously to Both v- and tSNAREs." *Biochemical and biophysical research communications* 286(3):616–21.
- Wemhöner et al. 2015. "An N-terminal deletion variant of HCN1 in the epileptic WAG/Rij strain modulates HCN current densities." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8:63
- Wemhöner et al. 2012. "A Leucine Zipper Motif Essential for Gating of Hyperpolarization-Activated Channels." *Journal of Biological Chemistry* 287(48):40150–60.
- Williams und Stuart 2000. "Site Independence of EPSP Time Course Is Mediated by Dendritic I(h) in Neocortical Pyramidal Neurons." *Journal of neurophysiology* 83(5):3177–82.
- Wollmuth 1995. "Multiple Ion Binding Sites in Ih Channels of Rod Photoreceptors from Tiger Salamanders." *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 430(1):34–43.
- Yan et al. 2003. "Ventricular Repolarization Components on the Electrocardiogram: Cellular Basis and Clinical Significance." *J Am Coll Cardiol* 42(3):401–9.

- Yan und Antzelevitch 1998. "Cellular Basis for the Normal T Wave and the Electrocardiographic Manifestations of the Long-QT Syndrome." *Circulation* 98(18):1928–36.
- Yang et al. 2012. "Drosophila Vap-33 Is Required for Axonal Localization of Dscam Isoforms." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32(48):17241–50.
- Yang und Murray 2011. "Ionic Mechanisms of Pacemaker Activity in Spontaneously Contracting Atrial HL-1 Cells." *Journal of cardiovascular pharmacology* 57(1):28–36.
- Yu et al. 2001. "MinK-Related Peptide 1: A Beta Subunit for the HCN Ion Channel Subunit Family Enhances Expression and Speeds Activation." *Circulation research* 88(12):E84–87.
- Zagotta et al. 2003. "Structural Basis for Modulation and Agonist Specificity of HCN Pacemaker Channels." *Nature* 425(6954):200–205.
- Zolles et al. 2006. "Pacemaking by HCN Channels Requires Interaction with Phosphoinositides." *Neuron* 52(6):1027–36.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μA	Mikroampere
AAA	ATPases Associated with a variety of cellular Activities
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
APD50	Breite Aktionspotential bei 50% der Gesamtamplitude (in Millisekunden)
APD90	Breite Aktionspotential bei 90% der Gesamtamplitude (in Millisekunden)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CC	Coiled Coiled
cDNA	komplementäre DNS
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHO	Chinese Hamster Ovary – Zelllinie
CNBD	Cyclic nucleotide binding domain
cRNA	codierende RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalografie
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FBS	Fetales Kälber Serum
FFAT	Bindemotiv für Lipidproteine
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Gluthation-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel
HeLa	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, benannt nach Henrietta Lachs
I	Strom
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IGL	innere Granulaschicht
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KCNE2	Potassium voltage-gated channel subfamily E member 2
l	Liter
LB	Lysogeny Broth – Kulturmedium für Bakterien
LTP	Langzeit-Potenzierung,
LTP	Lipid-transfer Protein
LW	Leuzin und Tryptophan
LWHA	Leuzin, Tryptophan, Histidin und Alanin

M	Molar
MAP2	Microtubule-associated protein 2
Min	Minuten
MIRP1	Untereinheit des KCNE2
MO	Morpholino
mRNA	messenger RNA
MSP	Major Sperm Domäne
mV	Millivolt
MΩ	Megaohm
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
pA	Pikoampere
PCR	Polymerase Chain Reaction
pF	Pikofarad
PFA	Paraformaldehyd
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden pro Minute
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sek	Sekunden
shRNA	short hairpin RNA (Haarnadel-RNA)
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SOC	Super Optimal Broth – Nährmedium für Bakterien
TEVC	Two Electrode Voltage Clamp
TM	Transmembran
ü.N.	über Nacht
UBP	Ubiquitinase
$V_{1/2}$	Halbmaximale Spannung der Aktivierung
VAMP1	Vesicle-Associated Membrane Protein 1
VAMP2	Vesicle-Associated Membrane Protein 2
VAP	VAMP-associated Protein
VAPA	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A
VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B
VAPC	Vesicle-associated membrane protein-associated protein C
vgl.	Vergleichbar
YIF1A	YIP1-interacting factor homolog A

6.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1	Struktureller Aufbau einer Untereinheit des HCN-Kanals (mod. nach Biel et al. 2009)	4
Abbildung 1.2	Die Spannungsabhängigkeit und die Aktivierungskinetik der einzelnen Untereinheiten	6
Abbildung 1.3	Aufbau des VAPA- und VAPB-Proteins	14
Abbildung 1.4	Bedeutung der VAP-Proteine im SNARE-Komplex (modifiziert nach Lev et al. 2008)	17
Abbildung 1.5	Funktionsweise des Split-Ubiquitin-Hefe-Zwei-Hybridsystems	20
Abbildung 1.6	Aminosäuresequenz des VAPB-Proteins mit dem gefischten Bereich aus dem cDNA-Bibliothek-„Screens“	20
Abbildung 1.7	Nachweis der Protein-Protein Interaktion von HCN2 und VAPB (modifiziert nach Walecki 2011)	21
Abbildung 1.8	Modulation der Stromamplitude durch VAPB (modifiziert nach Walecki 2011)	22
Abbildung 1.9	Mechanismus der VAPB Interaktion mit HCN2 (modifiziert nach Walecki 2011)	23
Abbildung 2.1	Schematische Darstellung des GST-Komplexes	36
Abbildung 2.2	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der „GST-Pulldown“-Experimente bei der Verwendung eines Zelllysats	37
Abbildung 3.1	Die getesteten GST-Fusionsproteine zeigen eine nachweisbare Interaktion mit dem HCN2-Kanal	49
Abbildung 3.2	„GST-Pulldown“ mit endogenem HCN2-Protein zeigte eine spezifische Interaktion mit allen getesteten GST-Fusionsproteinen	51
Abbildung 3.3	<i>In vitro</i> -translatiertes HCN2-Protein interagiert mit den GST-Fusionsproteinen	52
Abbildung 3.4	Das VAPB-Protein liegt im Komplex mit dem HCN2- und dem VAPA-Protein vor	53
Abbildung 3.5	Die Spannung der halbmaximalen Aktivierung des HCN2-Kanals und die Geschwindigkeit der Aktivierung werden nicht durch das VAPB-Protein beeinflusst	56
Abbildung 3.6	Das VAPB-Protein hat keinen Einfluss auf die pharmakologischen Eigenschaften des HCN2-Kanals	58
Abbildung 3.7	Das VAPB-Protein ist nicht in der Lage die Stromamplitude anderer Ionenkanäle zu modulieren	59

Abbildung 3.8	Die Stromamplitude des HCN2-Kanals wird durch VAPA konzentrationsabhängig moduliert.....	60
Abbildung 3.9	Das VAPC-Protein hat keinen Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des HCN2-Kanals.....	62
Abbildung 3.10	Das VAMP1-Protein moduliert die HCN2-Stromamplitude konzentrationsabhängig	63
Abbildung 3.11	VAMP2 hat keinen Einfluss auf die Stromamplitude des HCN2- Kanals bei einer geringen Überexpression.....	64
Abbildung 3.12	Das VAPB-P56S ist partiell in der Lage, die Stromamplitude des HCN2-Kanals zu modulieren	65
Abbildung 3.13	Die Ko-Expression mit einem Komplex aus VAPB- und VAPA- Protein führt zu einer Vergrößerung der Stromamplitude des HCN2-Kanals.....	66
Abbildung 3.14	Das VAPB-Protein ko-lokalisiert in ER-ähnlicher Struktur mit dem HCN2-Kanal	68
Abbildung 3.15	Der HCN2-Kanal befindet sich mit und ohne VAPB bevorzugt im ER der Zelle.....	69
Abbildung 3.16	Das VAPB- und das VAPB-TM-Protein ko-lokalisiert mit dem Endoplasmatischen Retikulum und dem HCN2-Kanal	70
Abbildung 3.17	VAPB-TM zeigt zeitabhängige Ko-Lokalisation mit dem HCN2- Kanal an der Zellmembran	72
Abbildung 3.18	VAPB und VAPB-P56S haben einen Einfluss auf die Distribution des HCN2-Kanals in kortikalen Neuronen	74
Abbildung 3.19	Hefe-Zwei-Hybrid Experimente lassen eine geringe Relevanz des C-Terminus an der Interaktion zwischen VAPB und dem HCN2-Kanal (mod. nach Walecki 2011).....	76
Abbildung 3.20	Auch C-terminale Trunktionsmutanten des HCN2-Kanals werden durch das VAPB-Protein in ihrer Stromamplitude moduliert.....	77
Abbildung 3.21	Der N-terminal trunkierte HCN2-Kanal wird nicht durch VAPB moduliert.....	78
Abbildung 3.22	Das VAPB-Protein moduliert die Stromamplitude und die Oberflächenexpression des HCN2-HA-Kanals.....	80
Abbildung 3.23	Die Transmembrandomäne des VAPB-Proteins moduliert die Oberflächenexpression des HCN2-Kanals.....	81
Abbildung 3.24	Die Oberflächenexpression des HCN2-NTK-HA in Oozyten wird nicht durch das VAPB-Protein moduliert	82

Abbildung 3.25	Die Oberflächenexpression von HCN2 eGFP-HA (N-terminal) wird durch VAPB und VAPB-TM signifikant erhöht	83
Abbildung 3.26	Imaging der HeLa-Zellen aus dem Oberflächenassays bestätigen die Ergebnisse aus den luminometrischen Experimenten	84
Abbildung 3.27	Nachweis des shRNA „Knock-Downs“	86
Abbildung 3.28	Die Schlagfrequenz der HL-1 Zellen ist abhängig von der VAPB-Expression	86
Abbildung 3.29	Das VAPB-Protein erhöht die Wahrscheinlichkeit für einen I_f -Strom in HL-1 Zellen.....	88
Abbildung 3.30	Eine Transfektion des VAPB-Protein führt in HL-1 Zellen zu einer Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des I_f -Stroms	89
Abbildung 3.31	Stromanalyse des I_f -Stroms während des shRNA „Knock-Downs“	91
Abbildung 3.32	Die Transfektion mit shVAPB führt zu einer Reduktion der Aktionspotentialfrequenz bei Patch-Clamp Messungen	92
Abbildung 3.33	Schematische Darstellung der analysierten Aktionspotential-Parameter	93
Abbildung 3.34	Die shVAPB führt zu einer Verlängerung der diastolischen Depolarisation, sowie APD_{50} und APD_{90}	94
Abbildung 3.35	„Tail Cuff“ Messungen an den Schwanzenden der VAPB „Knock-Out“-Mäuse.....	95
Abbildung 3.36	Beispiel-EGK Messungen der homo- und heterozygoten VAPB „Knock-Out“-Mäuse	96
Abbildung 3.37	Die VAPB „Knock-Out“-Tiere zeigen eine verringerte Herzfrequenz, eine veränderte QT-Zeit und ein verlängertes RR-Interval	96
Abbildung 3.38	Die heterozygoten VAPB ^{+/-} Mäuse zeigen keinen signifikanten Phänotyp	97
Abbildung 3.39	Analyse der EKG Messungen junger Tiere.....	98

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Übersicht über die Expression der HCN-Untereinheiten im Gehirn der Maus.....	8
Tabelle 1.2	Übersicht über die HCN-„Knock-Outs“ und deren Auswirkungen	12
Tabelle 1.3	Übersicht über die beschriebenen Interaktionspartner der VAP-Proteine	16
Tabelle 3.1	Übersicht über die Ergebnisse der Aktivierungskinetik	57
Tabelle 3.2	Übersicht über die Aktivierungskinetik bei einer Ko-Expression mit VAPA	61

6.4 Verwendete Plasmide

Für das Imaging der Zellkulturzellen und in Neuronen wurden folgende Konstrukte verwendet:

Konstrukt	Spezies	Resistenz	Verwendung	Promotor
HCN2 eGFP	Maus	Kanamycin	Imaging	CMV
VAPB P56S HA pGW1	Human	Ampicillin	Neuronales Imaging	CMV
VAPB pcDNA3.1	Human	Ampicillin	Imaging	CMV
VAPB pDsRed	Human	Kanamycin	Imaging	CMV
VAPB-HA pGW1	Human	Ampicillin	Neuronales Imaging	CMV
VAPB-TM pDsRed	Human	Kanamycin	Imaging	CMV

Für die TEVC Messungen wurden folgende Konstrukte verwendet:

Konstrukt	Spezies	Resistenz	Verwendung	Promotor
HCN2 NTK pSP64T	Maus	Ampicillin	TEVC	SP6
HCN2-F486X pBF1	Maus	Ampicillin	TEVC	SP6
HCN2-HA pBF1	Maus	Ampicillin	TEVC	SP6
HCN2-L530X pBF1	Maus	Ampicillin	TEVC	SP6
HCN2-V628X pBF1	Maus	Ampicillin	TEVC	SP6
KCNQ1 pSP64T	human	Ampicillin	TEVC	SP6
Kv1.4 pXOOM	Ratte	Neomycin	TEVC	T7
Kv1.5c pSGEM	human	Ampicillin	TEVC	T7
Kv4.3 pSGEM	human	Ampicillin	TEVC	T7
VAMP1 pSGEM	human	Ampicillin	TEVC	T7
VAMP2 pSGEM	human	Ampicillin	TEVC	T7
VAPB P56S pSGEM	human	Ampicillin	TEVC	SP6
VAPB pSGEM	human	Ampicillin	TEVC	SP6
VAPC pSGEM	human	Ampicillin	TEVC	T7

Für die Experimente des shRNA Knock-Downs und Überexpressionsversuchen in HL-1 Zellen wurden folgende Plasmide verwendet:

Konstrukt	Spezies	Resistenz	Verwendung	Promotor
eGFP Leervektor		Kanamycin	Überexpression	CMV
Non Silencing shRNA	Maus	Ampicillin	shRNA Knock-Down	CMV
pcDNA3.1 Leervektor		Ampicillin	Überexpression	CMV
VAPB pcDNA3.1	Human	Ampicillin	Überexpression	CMV
VAPB V3LMM_417270 pGIPZ	Maus	Ampicillin	shRNA Knock-Down	CMV

Die GST-Pulldown-Experimente wurden mit den nachfolgenden klonierten Konstrukten durchgeführt:

Konstrukt	Spezies	Resistenz	Verwendung	Promotor
pGEX4-T1 Leervektor		Ampicillin	GST-Pulldown	Tac
VAMP1 pGEX4-T1	Human	Ampicillin	GST-Pulldown	Tac
VAMP2 pGEX4-T1	Human	Ampicillin	GST-Pulldown	Tac
VAPA pGEX4-T1	Human	Ampicillin	GST-Pulldown	Tac
VAPB pGEX4-T1	Human	Ampicillin	GST-Pulldown	Tac
VAPC pGEX4-T1	Human	Ampicillin	GST-Pulldown	Tac

6.5 Publikationen

1. Erstautorenpublikationen

A novel HCN2 subunit modulates cardiac and thalamic pacemaker currents

Silbernagel, N., Walecki, M., Schäfer M., Kessel, M., Wemhöner, K., Zobeiri, M., Fortmüller, L., Scekić-Zahirovic, J., Rinné, S., Netter, M. F., Monnassier, L., Just, S., Dupuis, L., Fabritz, L., Budde, T. and Decher, N. (2015). *Acta Physiologica*, Volume 213, Issue Supplement S669. Vortrag, 94th Annual Meeting | Deutsche Physiologische Gesellschaft.

A novel HCN2 pacemaker channel interaction partner modulates surface expression and channel conductivity

Silbernagel, N., Walecki, M., Rinné S. and Decher N. (2014). *Acta Physiologica*, Volume 210, Supplement 695. Posterpräsentation. 93th Annual Meeting | Deutsche Physiologische Gesellschaft

Leucine Zipper Motif Essential for Gating of Hyperpolarization-activated Channels

Wemhöner, K., **Silbernagel, N.**, Marzian, S., Netter, M. F., Rinné, S., Stansfeld, P. J., and Decher, N. (2012). *The Journal of Biological Chemistry*, Volume 287(48).

2. Weitere Publikationen

An N-terminal deletion variant of HCN1 in the epileptic WAG/Rij strain modulates HCN current densities.

Wemhöner, K., Kanyshkova, T., **Silbernagel, N.**, Fernandez-Orth, J., Bittner, S., Kiper, A. K., Rinné, S., Netter, M. F., Meuth, S. G., Budde, T. and Decher, N. (2015). *Frontiers of Molecular Neuroscience*, 8:63.

TASK-1 and TASK-3 may form heterodimers in human atrial cardiomyocytes

Rinné, S., Kiper, A. K., Schlichthörl, G., Dittmann, S., Netter, M. F., Limberg, S. H., **Silbernagel, N.**, Zuzarte, M., Moosdorf, R., Wulf, H., Schulze-Bahr, E., Rolfes, C. and Decher, N. (2015) *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Volume 81.

Gain-of-function mutation in TASK-4 channels and severe cardiac conduction disorder.

Friedrich, C., Rinné, S., Zumhagen, S., Kiper, A. K., **Silbernagel, N.**, Netter, M. F., Decher, N. (2014) *EMBO Molecular Medicine*, 6(7), 937–951.

6.6 Liste akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer während meines Studiums der Diplombiologie an der Universität Hohenheim (2006-2011) waren:

Anken, Beifuß, Blum, Breer, Cerny, Conrad, Dalitz, Dinkel, Dressler, Eberspächer, Eckhardt, Einholz, Haas, Hanke, Hilbig, Huber, Jetter, Keller, Kiefer, Klein, Kuhn, Küppers, Maier, Nagel, Pfitzner, Preiss, Romig, Rosenkranz, Rösner, Schaller, Schweickert, Shcherbakov, Spring, Staiber, Steidle, Strasdeit, Stößer, Tapfer, Tolasch, Ulrich, Wulfmeyer, Wurster, Zimmermann

6.7 Danksagung

Im Laufe meiner Doktorarbeit gab es viele Menschen die mich auf meinem Weg begleitet haben. Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Niels Decher für die Überlassung des Themas und die fortwährende Unterstützung im Laufe der Arbeit. Danke auch für den vielseitigen Einblick in den Bereich der Elektrophysiologie und Molekularbiologie in den verschiedensten Projekten. Danke auch für das Vertrauen in meine Person, dass ich neue Aufgaben bewältigen konnte und mir die Möglichkeit der akademischen und persönlichen Entwicklung gegeben wurde.

Ein besonderer Dank geht auch an all meine Weggefährten im Labor: Dr. Susanne Rinné, Dr. Anne-Kathrin Streit, Dr. Stefanie Marzian, Dr. Michael Netter, Dr. Konstantin Wemhöner, Lina Matschke, Aytug Kiper, Miroslav Gleiche; Beatriz Ortiz-Bonnin; Oxana Nowak, Vanessa Huhn und Andrea Schubert. Für so manch technische Hilfe gilt mein Dank den Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt. Euch allen möchte ich für eure Unterstützung im Labor danken, aber auch für die Zeit außerhalb des Labors, die Marburg so richtig schön gemacht hat!

Vielen Dank auch an die, die mich tatkräftig bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben: Dr. Anne-Kathrin Streit, Dr. Michael Netter, Dr. Stefanie Marzian, Lina Matschke, Melanie Gehrung, Ivonne Mußnug und Matthias Heinle.

Zum Schluss möchte ich natürlich noch meinen Eltern danken, die mir all das durch ihre Unterstützung ermöglicht haben. Natürlich auch meiner Schwester Katja und meinem Schwager Dirk mit meinem Neffen Linus. Ein großer Dank geht auch an den Rest meiner Familie und an Matthias, der mich immer wieder motiviert und bedingungslos unterstützt hat.